ÉCOLE NATIONALE VETÉRINAIRE DE TOULOUSE

ANNÉE 1972 — N° 14

ESSAI DE PROPHYLAXIE DE LA MYCOPLASMOSE DES GALLINES

Le lavage - Trempage des œufs à couver

THESE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(DIPLOME D'ÉTAT)

Présentée et soutenue publiquement en avril 1972

DEVANT

L'UNIVERSITÉ PAUL-SABATIER DE TOULOUSE

PAR

GUILLOT Jean-François, René, Elie

né le 14 mai 1945 à SAINT-GEORGES-DU-BOIS (Charente-Maritime)

Jury :

Président M. MONNIER, Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

Assesseurs M. TOURNUT, Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

M. ESPINASSE, Prof. à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

TOULOUSE

IMPRIMERIE DU VIGUIER

6, rue Ninau, 6

—

1972

ESSAI DE PROPHYLAXIE DE LA MYCOPLASMOSE DES GALLINES

Le lavage - Trempage des œufs à couver

ÉCOLE NATIONALE VETÉRINAIRE DE TOULOUSE

ANNÉE 1972 — N° 14

ESSAI DE PROPHYLAXIE DE LA MYCOPLASMOSE DES GALLINES

Le lavage - Trempage des œufs à couver

THESE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(DIPLOME D'ÉTAT)

Présentée et soutenue publiquement en avril 1972

DEVANT

L'UNIVERSITÉ PAUL-SABATIER DE TOULOUSE

PAR

GUILLOT Jean-François, René, Elie

né le 14 mai 1945 à SAINT-GEORGES-DU-BOIS (Charente-Maritime)

Jury :

Président M. MONNIER, Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

Assesseurs M. TOURNUT, Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

M. ESPINASSE, Prof. à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

TOULOUSE

IMPRIMERIE DU VIGUIER

6, rue Ninau, 6

—

1972

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur ..... M. FLORIO
Directeurs Honoraires .. MM. PONS
DARRASPEN

Professeur Honoraire: M. LOMBARD

PERSONNEL ENSEIGNANT

Chaire de Pharmacie et Toxicologie :

Professeur titulaire ..... M. GODFRAIN
Maître-Assistant ..... Mme BURGAT-SACAZE

Pharmacie et Toxicologie

Chaire de Physique et Chimie Biologiques et Médicales :

Professeur titulaire ..... M. RICO

Physique biologique et médicale
Chimie biologique et médicale

Chaire d'Anatomie des Animaux Domestiques :

Professeur titulaire ..... M. PAVAUX

Anatomie descriptive - Extérieur
Anatomie appliquée - Tératologie

Chaire de Physiologie et Thérapeutique :

Professeur titulaire ..... M. RUCKEBUSCH
Maître-Assistant Agrégé .. M. FARGEAS

Physiologie - Thérapeutique et Pharmacodynamie

Chaire d'Histologie - Anatomie Pathologique :

Professeur titulaire ..... M. VAN HAVERBEKE

Maître de Conférences, non chef de Service, Prof. sans Chaire ..... M. CABANIE
Maître-Assistant ..... M. MAGNOL

Histologie - Embryologie - Anatomie Pathologique

Chaire d'Hygiène et Industrie des Aliments d'origine animale :

Professeur titulaire ..... M. LABIE
Maître-Assistant ..... M. EECKHOUTTE

Hygiène, Inspection, Contrôle et Technologie des denrées alimentaires d'origine animale

Chaire de Parasitologie et Maladies Parasitaires :

Professeur titulaire ..... M. BRIZARD
Maître-Assistant Agrégé .. M. DORCHIES

Zoologie appliquée - Parasitologie externe
Parasitologie interne - Clinique

Chaire de Sémiologie et Pathologie Médicale des Equidés et Carnivores :

Professeur titulaire ..... M. FLORIO
Maître de Conférences, non Chef de Service, Prof. sans Chaire ..... M. LESCURE
Maître-Assistant ..... M. GUELFI

Sémiologie et Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores - Législation Vétérinaire et Déontologie Clinique

Chaire de Pathologie Médicale du Bétail et des animaux de basse-cour :

Professeur titulaire ..... M. TOURNUT

Maître de Conférences, non chef de Service, Prof. sans Chaire ..... M. ESPINASSE
Maître-Assistant ..... M. BEZILLE

Sémiologie et Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour - Clinique
Clinique ambulatoire

Chaire de Pathologie Chirurgicale :

Professeur titulaire ..... M. CAZIEUX

Propédeutique et Sémiologie chirurgicale
Technique chirurgicale - Pathologie chirurgicale
Podologie - Clinique

Chaire de Pathologie de la Reproduction :

Professeur titulaire ..... M. BERTHELON
Maître de Conférences, non Chef de Service, Prof. sans chaire ..... M. ROYAL

Sémiologie et propédeutique
Pathologie de la Reproduction
Obstétrique - Clinique

Chaire de Maladies Contagieuses - Zoonoses - Législation Sanitaire :

Professeur titulaire ..... M. SAURAT
Maître-Assistant Agrégé .... M. CHANTAL

Maladies Contagieuses - Zoonoses
Législation Sanitaire

Chaire de Pathologie Générale - Microbiologie - Immunologie :

Professeur titulaire ..... M. LAUTIE
Maître-Assistant ..... M. MEIGNIER

Microbiologie - Immunologie
Pathologie Générale

Chaire de Zootechnie et Economie Rurale :

Professeur titulaire ..... M. QUEINNEC
Maître-Assistant ..... M. DARRE

Ethnologie - Génétique appliquée - Hygiène Générale
Zootechnie - Elevage - Economie Générale et des productions animales

Chaire d'Alimentation :

Professeur titulaire ..... M. FALIU
Maître-Assistant Agrégé .. M. GRIESS

Botanique appliquée et Bromatologie
Agronomie - Alimentation

COURS COMPLEMENTAIRES
CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Antibiothérapie des Maladies infectieuses ..... M. MONNIER
Aspect médical des Zoonoses ..... M. ARMENGAUD
Energétique ..... M. LABOUCHE
Initiation à l'informatique biomédicale ..... M. FERNET
Agronomie ..... M. COMBRET
Métabolismes ..... M. RAYNAUD

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsables des opinions émises par les candidats (Délibération de la Faculté, en date du 10 mai 1891 et du Conseil de l'Ecole, en date du 13 juin 1924).

UNIV. LEIDEN BIBL.

A MES PARENTS

En témoignage de mon affection et des sacrifices qu'ils ont consenti pour moi.

Ce travail n'est que le modeste reflet de leur courage et de leurs espoirs.

A MA FIANCÉE

En témoignage de ma profonde tendresse.

A MA TANTE

A TOUS MES AMIS

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR MONNIER

de l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

Qui nous a fait le très grand honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Hommages respectueux.

A NOTRE JURY DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR TOURNUT

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Qui nous a confié le sujet de cette thèse et nous a toujours prodigué ses conseils.

Qu'il soit assuré de notre vive reconnaissance.

MONSIEUR LE PROFESSEUR ESPINASSE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Qui nous a constamment guidé dans l'élaboration de ce travail.

En témoignage de notre profonde gratitude.

A MONSIEUR LE DOCTEUR COCHEZ

Directeur Adjoint de Recherches à l'I.N.R.A.,
Directeur de la Station Expérimentale d'Aviculture du Magneraud.

Pour la confiance qu'il nous a manifestée, qu'il soit assuré de notre profond respect.

A MONSIEUR LE DOCTEUR BALENÇON

Chargé de la Direction du Laboratoire de Pathologie
de la Station Expérimentale d'Aviculture du Magneraud.

Pour les renseignements qu'il a bien voulu nous fournir lors de l'élaboration de notre travail.

Toute notre reconnaissance.

A MONSIEUR LE DOCTEUR PAPAGEORGIOU

En hommage à la grande patience et à la souriante simplicité qu'il nous a manifestées dans l'enseignement de sa spécialité.

Notre profonde gratitude.

A MONSIEUR MEURAUD

Pour les conseils qu'il n'a cessé de nous prodiguer.

Notre profond respect.

A MONSIEUR LE DOCTEUR MONTLAUR

En hommage à la sympathie qu'il nous a toujours manifestée.

Qu'il trouve ici l'expression de notre reconnaissance.

A TOUS NOS MAITRES

DE L'ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE

DE TOULOUSE

INTRODUCTION

L'importance des pertes économiques dues à la pathologie : mortalité, diminution de performances, coût des traitements, représente pour l'aviculture française une perte minimum de 300 millions de francs par an.

Pour Meurier, Bennejean et Le Turdu [40], le syndrome chronique respiratoire, à lui seul, serait responsable de 36 % de ces pertes.

A l'heure où la véritable industrialisation de l'aviculture semble percer, où des méthodes modernes de planification du marché voient le jour, un contrôle efficace de la pathologie s'avère nécessaire pour diminuer le pourcentage qu'elle détient dans le prix de revient des produits avicoles.

Dans cette optique, la prophylaxie devient nettement prépondérante face à la thérapeutique que l'on cherche à éviter dans tout élevage industriel.

La prophylaxie médicale n'est pas sans limites et l'élevage orthoxénique (Schellenberg [57]), œuvre de la prophylaxie hygiénique, est une des solutions de demain.

Cependant, une étape transitoire sépare ces deux types de prophylaxie et le trempage des œufs à couver est une des méthodes intermédiaires qui permettra d'amorcer la prophylaxie hygiénique dans l'univers complexe du syndrome respiratoire chronique.

Après un rappel des caractéristiques de ce syndrome, en ce qui concerne l'historique, l'étiologie, l'épizootiolo-

gie, le diagnostic et la prophylaxie, nous envisagerons un mode particulier de prophylaxie médicale : le trempage des œufs à couver.

PREMIÈRE PARTIE

LE SYNDROME RESPIRATOIRE CHRONIQUE

DÉFINITION

Selon Brion [*in* 24], les maladies infectieuses des volailles frappant l'appareil respiratoire peuvent être classées en quatre catégories :

— *Affections virales :* infections à myxovirus dont surtout la maladie de Newcastle, bronchite infectieuse, laryngo-trachéite infectieuse, variole.

— *Affections microbiennes :* pasteurellose, pullorose et coryza infectieux dû à *Hemophilus gallinarum.*

— *Affections néo-rickettsiennes:* groupe de l'ornithose psittacose.

— *La maladie respiratoire chronique :*

Tous les auteurs s'accordent pour désigner sous ce nom une maladie d'allure subaiguë, de contagiosité irrégulière, dont les caractères sont les suivants :

— Chez les jeunes sujets, la maladie respiratoire chronique peut se traduire par une inflammation des parties supérieures des voies aériennes et des muqueuses ayant avec elles des rapports anatomiques : un coryza à jetage séreux ou séro-muqueux provoquant des éternuements, conjonctivite, sinusite; une inflammation de la trachée se traduisant par des râles, de la toux ou la difficulté respiratoire — dans un second stade, ou parfois primitivement, ce sont les organes profonds qui sont atteints et la symptomatologie est très pauvre. Elle se borne à une accélération respiratoire, de la toux. Dans tous les cas, il y a une incidence plus ou moins importante sur la croissance, d'où la gravité économique de la maladie, car la mortalité est, en la règle, très faible.

— Chez les poules adultes, la M.R.C. provoque une baisse de ponte, une diminution du taux d'éclosion des œufs; enfin, elle peut avoir une répercussion sur la viabilité des poussins nés.

— Les lésions reflètent l'inflammation des premières voies, avec un épaississement des muqueuses nasales et sinusales, parfois une congestion et un piqueté hémorragique de la trachée; on trouve très souvent un exsudat muqueux ou caséeux dans la trachée et surtout dans les sacs aériens dont les parois sont épaissies et opaques; un exsudat peut exister dans le poumon, sur le péricarde, le foie, le péritoine, les ovaires.

Histologiquement, on ne remarque qu'une infiltration lymphoïde des muqueuses, mode réactionnel assez banal chez les oiseaux, avec formation de granulomes.

HISTORIQUE

L'individualisation de la M.R.C. est récente.

Cependant, les aviculteurs américains connaissent cette maladie depuis déjà longtemps puisque c'est Nelson [*in* 4] qui, en 1935-1936, découvrit le premier, dans l'exsudat nasal d'un coryza, de petits corpuscules colorables au giemsa qu'il appela « corps coccobacilliformes » et que l'on dénommera aussi par la suite « corps de Nelson ».

Dans ses travaux, il différencia trois types de coryza :

— un coryza bactérien dû à *Hemophilus gallinarum*;

— un coryza dû à ses corps coccobacilliformes;

— un coryza dû à l'action conjuguée des deux agents précédents.

En 1943, Delaplane et Stuart [*in* 50] étudient « une maladie respiratoire chronique » du poulet. Son agent qui cultive sur œuf embryonné y est décrit comme virus.

C'est Markham et Wong, en 1952 [*in* 50], qui réussissent à cultiver l'agent de la M.R.C. en milieu privé de cellules et suggèrent de le classer dans le groupe des PPLO, par analogie avec l'agent de la péripneumonie des bovidés qui a été le premier découvert par Nocard et Roux en 1898 [*in* 51].

Remarquons avec Bankowski [6] que, en 1951, l'incidence de cette M.R.C. a augmenté dans de telles proportions qu'elle a menacé l'industrie des poulets de chair tout le long de la côte orientale des Etats-Unis.

Déjà, aux Etats-Unis, on entrevoyait la pluralité étiologique de cette maladie, sous l'aspect d'une synergie bactérienne, mycoplasmique et virale. Dans les différents isolements les mycoplasmes prévalaient, mais ADLER, en 1955 [*in* 6], mis l'accent sur la synergie virale qui exaltait ces infections mycoplasmiques.

En 1954, au Canada, FAHEY et CRAWLEY [23] isolent un virus vrai. Ce virus est différent de tous les autres connus, mais il semble qu'il n'ait joué qu'un rôle épisodique, car il n'est pas retrouvé par les différents auteurs qui l'ont recherché dans les cas de M.R.C.

En France, la mycoplasmose aviaire a fait son apparition vers 1955, à la suite d'importations de poussins et d'œufs provenant de pays infectés.

Elle a d'ailleurs été bien individualisée, dès 1958, par BRION et FONTAINE [10 et 12].

Depuis, elle sévit à l'état enzootique et si les estimations actuelles sont contradictoires, notamment en ce qui concerne le rôle joué par le genre Mycoplasma, ceci tient à l'imperfection des méthodes diagnostiques, et notamment aux difficultés rencontrées pour réaliser l'isolement de ces micro-organismes.

Ainsi, au fur et à mesure que les techniques de laboratoire se sont améliorées et que les procédés de culture et d'identification se sont montrés plus efficaces, l'importance attribuée aux mycoplasmes s'est avérée sans cesse grandissante (ADLER, 1965 [1]; HALEN, 1967 [26]).

ÉTIOLOGIE

A) Rappel anatomique sur l'appareil respiratoire des oiseaux.

L'appareil respiratoire des oiseaux présente certaines particularités le différenciant des autres espèces animales:

Au niveau de l'appareil pulmonaire :

— absence de plèvre et de diaphragme;

— présence de diverticules bronchiques en rapport direct avec la trachée, appelés sacs aériens. Ils sont au nombre de 8 : 3 pairs et 2 impairs qui se décomposent en :

— 2 thoraciques antérieurs,

— 2 thoraciques postérieurs,

— 2 abdominaux,

— 1 cervical,

— 1 claviculaire.

Remarquons dès maintenant que les sacs aériens abdominaux sont en contact avec le péritoine, ce qui explique l'atteinte fréquente des viscères (périhépatite, périsplénite, salpingite), la péricardite n'étant que la conséquence d'une septicémie.

Au niveau des os : les os pneumatiques.

L'ensemble forme un tout de meilleur augure pour l'adaptation au milieu aérien.

Les membranes des sacs aériens constituées de deux assises cellulaires peu vascularisées constituent le lieu d'élection de la prolifération des mycoplasmes.

Elles sont sans défense contre l'agression microbienne. D'autre part, la physiologie particulière de la respiration chez l'oiseau (apport partiel d'air directement de la trachée aux sacs aériens abdominaux, sans passer par la voie pulmonaire) expose constamment les sacs aériens, surtout abdominaux, à la contamination par les divers germes contenus dans l'air inspiré.

B) Les agents microbiens.

Tous les auteurs admettent actuellement des origines microbiennes diverses, voyons l'importance relative de chacune d'entre elles.

En 1962, Renault, Guillon, Palisse [53] ont trouvé sur 76 cas de maladies respiratoires des voies aériennes inférieures sans complications fibrineuses :

Mycoplasme seul	17 %
Mycoplasme + virus de la bronchite infectieuse	42 %

Les mêmes auteurs ont trouvé sur 10 cas accompagnés de complications fibrineuses :

Mycoplasme + *E. coli*	16 %
Mycoplasme + *E. coli* + virus de la bronchite infectieuse	32 %
Mycoplasme + *E. coli* + virus de la bronchite infectieuse + virus de la maladie de Newcastle	4 %

1. *Les mycoplasmes*

Depuis que Nocard et Roux et leurs collaborateurs Borrel, Salimbeni et Dujardin-Beaumetz [*in* 51] ont isolé et étudié l'agent de la péripneumonie bovine en 1898, les mycoplasmes ont fait l'objet d'un très grand nombre de découvertes, tant chez l'homme, les oiseaux,

les moutons, le porc, le chien que, depuis 1965, chez les plantes.

Chez les volailles, ils furent identifiés pour la première fois par NELSON en 1935-1936 dans son coryza, type II [*in* 50].

Définition.

Ce sont des micro-organismes qui satisfont aux critères suivants définis par HAYFLICK et CHANOCK en 1965 [31] :

1) croissance sur milieux artificiels liquides ou solides (acellulaires) avec des colonies incrustées au moins par leur centre dans la gélose;

2) pléomorphisme très marqué (formes coccoïdes, en anneau, en massue, en chaînette, etc.) dû à l'absence de paroi rigide; membrane limitante à trois feuillets;

3) dimension de 125 à 150 nm pour les formes de reproduction les plus petites;

4) à l'exception des espèces saprophytes, le métabolisme des mycoplasmes exige un apport de stérols et de protéines dans le milieu de culture;

5) toutes les espèces sont résistantes à la pénicilline (de façon formelle) alors que la plupart des souches sont inhibées par de faibles concentrations de tétracycline;

6) la culture des mycoplasmes est inhibée pour les immunsérums spécifiques (caractère partagé seulement avec les leptospires et les virus) ;

7) les mycoplasmes sont des espèces stables (pas de « sortie » à partir d'une bactérie primitive, pas de retour vers une forme bactérienne originelle).

Taxinomie.

La classification des mycoplasmes la plus utilisée aujourd'hui est celle d'EDWARD et FREUNDT (1956) [*in* 51] :

Embranchement I. Protophytes (Sachs, 1874).

Classe II. Schizomycètes (Von Naegeli, 1857).

Ordre X. Mycoplasmatales (Freundt, 1955).

Deux familles :

1) *Mycoplasmataceae* :

espèces stérol-dépendantes,
type : *Mycoplasma mycoides.*

2) *Acholeplasmataceae* :

espèces non stérol-dépendantes,
type : *Acholeplasma laidlawii.*

Cette classification ne satisfait pas l'ensemble des taxinomistes et il existe des arguments fondés pour en faire une classe séparée entre les Schizomycètes et les microtatobiotes (Rickettsiales et virales).

Les mycoplasmes sont les plus petits organismes vivants possédant l'équipement enzymatique nécessaire pour effectuer la synthèse de leurs constituants à partir d'un petit nombre de matériaux inertes pré-existants.

Ils sont très répandus dans la nature, chez l'homme, les animaux et même les plantes pour lesquelles la transmission se fait par des vecteurs.

On a déterminé différentes espèces, soit saprophytes, non pathogènes ou pathogènes.

Mycoplasmes et formes L.

Un très grand nombre de caractères sont communs aux formes L et aux mycoplasmes, d'où la théorie, maintes fois soutenue, que les mycoplasmes n'étaient que des formes L stabilisées. Aucun exemple n'a pu être donné et le nombre de supporters de cette théorie diminue constamment (Minck et Fleck, 1970 [41]).

Bactériologie des mycoplasmes.

a) *Microscopie.*

L'examen microscopique des mycoplasmes peut se pratiquer sans coloration pour les cultures en milieu liquide avec observation en fond noir ou en contraste de phase.

La coloration des mycoplasmes est difficile et le meilleur procédé est sans aucun doute la coloration de May-Grünwald-Giemsa. En réalité, ce sont davantage des colonies que l'on colore que des germes isolés, en découpant des blocs de gélose porteurs de colonies.

La fluoroscopie simple (coloration à l'orangé d'acridine, par exemple) et l'immunofluorescence permettent aussi de bonnes observations.

Il faut noter que les frottis ou décalques effectués à partir de lésions ou de liquides pathologiques sont, en règle générale, décevants à examiner.

b) *Morphologie.*

1) *Microscopique* : Les mycoplasmes sont d'un polymorphisme extrême, surtout visible à l'isolement et au cours des premières cultures. Ceci rend le diagnostic microscopique impossible.

La morphologie tend ensuite nettement vers un type coccobacillaire. La taille varie entre 0,125 μ pour les formes granulaires et 2-3 μ pour les formes vésiculées.

2) *Des colonies sur milieu solide* : La colonie des mycoplasmes a l'aspect caractéristique d'un « œuf sur le plat », avec un noyau central surélevé et plus opaque à la lumière, un pourtour régulier et mince; elle est incrustée dans la gélose, au moins par son centre.

Leur taille est de 10 μ à 500 μ de diamètre, en général.

3) *Après culture sur nappes cellulaires* : Les souches virulentes cultivées sur fibroblastes d'embryons de poulet

provoquent un effet cytopathogène caractérisé par :

— une dégénérescence granuleuse du cytoplasme avec vacuolisation et arrondissement des cellules;

— ultérieurement une pycnose.

La présence des mycoplasmes, sous forme de granulations de 0,125 μ à 0,5 μ, peut être révélée par le May-Grünwald-Giemsa ou les anticorps fluorescents.

Avec les souches atténuées seul un ralentissement de la croissance peut être observé.

4) *Après culture sur embryon de poulet* : Lorsqu'on inocule des mycoplasmes dans le vitellus d'embryons de poulet, les cellules de la membrane vitelline subissent les mêmes transformations que les cellules en culture *in vitro*. Les dimensions des inclusions cytoplasmiques observées sont de 0,3 μ à 0,8 μ.

Propriétés physiques et biochimiques.

1) *Filtrabilité.*

Les unités étant de 125 nm, la limite est très bien indiquée par le simple filtre Millipore V C (0,100 μ).

2) *Sensibilité avec agents tensioactifs* (détergents, lauryl-sulfate de sodium), à la digitonine et la saponine.

3) *Sensibilité aux ultra-sons.*

4) *Hémagglutinine.*

Les souches aviaires possèdent cette propriété d'hémagglutination des érythrocytes qui permet de réaliser des hémagglutinations (HA) ou des inhibitions de l'hémagglutination (IHA) en tubes.

5) *Production de toxines.*

Mycoplasma gallisepticum possède une exotoxine thermolabile.

Culture des mycoplasmes.

La difficulté est liée à des impératifs techniques des milieux. L'isolement et l'entretien des souches de mycoplasmes ont toujours constitué de sérieux problèmes de bactériologie pratique; ce sont des espèces très exigeantes et les cultures sont maigres.

1) *Prélèvements.*

C'est l'exsudat prélevé dans la partie inférieure de la trachée qui produit les meilleurs résultats (Lecce et Sperling [*in* 15]).

2) *Milieux de culture acellulaires.*

Ces milieux contiennent au moins les trois ingrédients suivants :

— un milieu de base constitué par un extrait de viande (infusion de cœur de bœuf) ou une peptone ou les deux à la fois;

— un extrait ou un autolysat de levure de bière destiné à apporter les facteurs de croissance (vitamines du groupe B, acides nucléiques);

— du sérum à des taux allant de 10 à 30 %.

L'espèce animale qui fournit le sérum est presque indifférente, mais il est capital que ce sérum ne contienne pas d'anticorps et ne soit pas cytotoxique.

A ces trois constituants indispensables, on peut ajouter :

— un sucre (glucose),

— un système tampon (phosphates),

— du glycérol,

— des inhibiteurs bactériens, de règle lors des isolements, qui peuvent être de la pénicilline, de la colimycine, de l'acétate de thallium ou du cristal violet.

Le milieu de base est stérilisé par la chaleur, les autres constituants par filtration.

Les milieux utilisés pour les mycoplasmes aviaires sont ceux d'Adler, d'Albimi (recommandé par Chu), celui de Papageorgiou [46].

Milieu d'Adler.

C'est un milieu liquide ou solide. On utilise un milieu Difco P.P.L.O., composé de bouillon de cœur de bœuf et de peptone spéciale. On y ajoute de l'hydrolysat de levure, du glucose et de l'extrait d'embryon de poulet. Un indicateur (rouge de phénol) peut être additionné au milieu liquide.

Milieu d'Albimi (recommandé par Chu).

On le trouve dans le commerce sous forme liquide ou gélosée. On y ajoute pour l'emploi 20 % de sérum de cheval filtré, chauffé à 56°C pendant une heure, 20 000 unités de pénicilline et 1 cm^3 d'une solution à 5 % d'acétate de thallium, pour 100 cm^3 de milieu. On termine la préparation en y introduisant 1 % d'indicateur d'Andrade et l'on filtre.

La mise en culture se fait toujours par un ensemencement copieux, l'isolement en découpant un carré de gélose porteur de colonies, transporté tout entier, dans un tube de bouillon.

Il convient d'éviter soigneusement la dessiccation des boîtes de Pétri (chambre humide ou rubans adhésifs).

Le repiquage des cellules se fait, en général, tous les trois à six jours pour les souches de collection.

3) *Culture sur œuf embryonné.*

Bien que les mycoplasmes se multiplient par définition sur des milieux acellulaires, l'emploi des œufs embryonnés est intéressant pour les mycoplasmes très exigeants. Cependant, il y a danger d'une présence préalable de mycoplasmes dans les œufs.

L'inoculation se fait par injection de 0,1 à 0,3 ml d'une

suspension mycoplasmique dans le vitellus d'embryons de poulet âgés de 6 jours. L'infection est mortelle en cinq à sept jours.

4) *Cultures sur cellules vivantes.*

Intéressantes aussi pour les mycoplasmes exigeants, l'infection de nappes monocellulaires peut se réaliser en flacons ou en tubes. Les cellules sont des cellules rénales de poulet ou des fibroblastes d'embryons de poulets (ainsi que des cellules d'autres espèces animales).

L'effet cytopathique est irrégulier et aucune comparaison n'est à faire avec les infections virales.

Il faut surtout vérifier que les cellules ne contiennent pas préalablement de mycoplasmes.

5) *Cultures in vitro.*

Les souches virulentes cultivent bien dans le sinus infra-orbitaire et dans la trachée de dindons âgés de sept semaines.

Résistance des mycoplasmes.

Ce sont des micro-organismes fragiles, très sensibles à tous les antiseptiques usuels, aux détergents, à la chaleur (50 à 55°C), aux acides (variations de pH).

Ils sont détruits par les rayons ultra-violets, la putréfaction et ont une survie très limitée dans le milieu extérieur, à l'exception des saprophytes.

Pouvoir antigénique et pouvoir pathogène.

Le pouvoir antigène des mycoplasmes est très net, ce qui permet l'identification des souches par des méthodes sérologiques.

Parmi les nombreuses méthodes sérologiques applicables, deux prédominent : l'inhibition de croissance et l'inhibition du métabolisme, mais la composition antigénique reste mal connue et les résultats ne sont que

partiels, car le nombre des sérotypes apparaît de plus en plus grand. De plus les antigènes de groupe, très importants, rendent la préparation des sérums spécifiques difficile.

Le pouvoir pathogène peut aussi servir à classer les mycoplasmes. Dès 1956, de nombreux auteurs avaient fait la scission entre souches pathogènes et souches non pathogènes. Expérimentalement, on inocule des animaux « germ - free » par voie sinusale, intra-trachéale surtout, ou directement dans les sacs aériens. Les souches pathogènes nous donnent un syndrome respiratoire chronique, alors que l'action d'une souche non pathogène ne donne rien.

Suivant leur pouvoir pathogène naturel, on peut classer les mycoplasmes en trois catégories :

1) ceux à pouvoir pathogène essentiel, responsables de mycoplasmoses vraies;

2) ceux à pouvoir pathogène secondaire (infections associées ou de sortie);

3) ceux sans pouvoir pathogène (parasitisme simple).

Il semble que de nombreux mycoplasmes responsables de pneumonies animales ou humaines puissent être classés dans le second groupe.

En ce qui concerne le pouvoir pathogène expérimental, il est parfois difficile de reproduire la maladie naturelle.

Selon Perreau [51], les mycoplasmes des oiseaux peuvent actuellement être classés ainsi :

Mycoplasma gallisepticum (pathogène) :
Maladie chronique respiratoire.
Coryza infectieux des poules.
Sinusite infectieuse du dindon.

Mycoplasma gallinarum (non pathogène) :
Associé à diverses infections respiratoires.

Mycoplasma iners (non pathogène) :
Tractus respiratoires.

Mycoplasma meleagridis (pathogène) :
Infection des sacs aériens du dindon.

Mycoplasma synoviae (pathogène) :
Synovite infectieuse aviaire.

Mycoplasma anatis (? ?) :
Sinusite du canard.

Ces six espèces définies et les autres souches aviaires en attente de classification se distribuent en 19 groupes sérologiques (Dierks et al, 1967 [21]).

Les souches pathogènes appartiennent essentiellement au sérotype A: *Mycoplasma gallisepticum*, dont la souche la plus fréquemment rencontrée en France est la souche S 6 de Adler.

En 1969, Roberts et Ede [*in* 16], puis Mac Martin et Christie en 1970 [*in* 16], ont isolé deux nouvelles souches de mycoplasmes dénommées WS 7 et WR 1. Le WS 7 est sérologiquement parent avec la souche S 6, mais Chu [16] estime que le rôle de la souche WR 1 doit être clarifié.

Pouvoir immunogène.

Sur le plan de l'immunité, les mycoplasmes sont de mauvais antigènes. De là découlent les difficultés de préparation de vaccins efficaces.

Au niveau des anticorps, les plus intéressants sont les agglutinants et ceux inhibant la réaction d'hémagglutination des érythrocytes de poulet.

Pour Crawley et Fahey (1957) [20], ces anticorps inhibiteurs de l'hémagglutination apparaissent au minimum 9 jours après l'infection, en général 29 jours après.

Le taux maximum d'anticorps s'observe vers la septième

semaine après la contamination; mais il varie considérablement selon les animaux, les périodes sexuelles, l'évolution de la maladie et les traitements appliqués.

2. *Rôle des bactéries et virus*

Le rôle pathogène des mycoplasmes a été controversé (Beckmann et al, 1959 [7]).

Cependant, l'inoculation par voie respiratoire de *Mycoplasma gallisepticum* au poulet et au dindon axéniques provoque des lésions et l'apparition d'anticorps, alors que, dans les mêmes conditions, l'inoculation de souches saprophytes ne provoque ni troubles, ni élaboration d'anticorps (Smibert et al, 1959 [59]; Madden et al, 1967 [39]).

Cela ne confère pas aux mycoplasmes pathogènes un rôle prépondérant obligatoire et les années à venir permettront vraisemblablement de dire si les bactéries et les virus fréquemment rencontrés lors des accès respiratoires ont une place majeure dans l'étiologie ou ne sont que des éléments d'une flore secondaire.

Les bactéries.

Price, Zolli, Hardie et Gallian [52] ont montré que chez les sujets malades, le nombre de bactéries augmentait et que la flore à prédominance gram + semble évoluer vers une prédominance gram —.

— *gram* +

Composantes de la flore normale, des sacs aériens, elles ne provoquent des troubles que lors d'une altération épithéliale et cette fréquence est faible.

— *gram* —

Deux représentants sont importants :
Haemophilus gallinarum et *Escherichia coli*.

— Hæmophilus gallinarum.

Traditionnellement responsable du coryza infectieux des volailles, Nelson [*in* 15] avait vu une infection mixte à *Haemophilus gallinarum* et à mycoplasmes. Cependant son action est considérée en Europe comme minime.

Papageorgiou, Valette, Cherby et de Saint-Aubert en 1967 [50], montrant que l'activité enzymatique des mycoplasmes était différente de celle des formes L des bactéries, ont mis fin à la conception de quelques chercheurs qui voyaient dans les mycoplasmes des formes L d'*Haemophilus gallinarum.*

Actuellement, selon Kato [33], Corstvet et Mc Gill [17], *Haemophilus gallinarum* n'est qu'un germe de surinfection occasionnel.

— *Escherichia coli.*

Très souvent rencontré lors de M.R.C., sa présence soulève la controverse.

Renault et Maire, en 1967 [54], ont montré que certains sérotypes, 01, 02, 04, 08, 09, 017, 078 et 0109, sont particulièrement fréquents et doués de pouvoir pathogène pour le poulet.

Ils sont présents dans la litière, l'eau de boisson, l'air des locaux d'élevage, le tube digestif et l'appareil respiratoire des oiseaux (Harry et Hemsley 1965 [29]).

Leur présence dans la cavité pharyngienne et dans la trachée d'oiseaux normaux ne provoque pas obligatoirement de troubles.

D'après Stephens et al, 1965 [60], ces *Escherichia coli* passeraient dans les sacs aériens infectés par les mycoplasmes par la voie respiratoire supérieure plutôt que par la voie digestive.

Selon Harry et Hemsley [30], *Escherichia coli* ne se trouve dans les sacs aériens qu'en cas de maladie.

Pour Gross [25], ainsi que Smibert, de Volt et Fabert [58], il semble bien que *Escherichia coli* ne soit qu'un germe d'infection secondaire, capable de modifier l'allure clinique et la gravité de la maladie, et de créer certaines lésions dont les plus typiques sont des exsudations caséeuses des sacs aériens et du péricarde.

Ainsi, comme l'ont montré Fabricant et Levine en 1962 [22], *Escherichia coli* envahit les sacs aériens infectés par les mycoplasmes et les virus.

Les virus.

Le virus mis en évidence par Fahey et Crawley en 1954 [23] est, d'après les expériences de Subramanyam et Pomeroy [62], pratiquement incapable de produire des troubles respiratoires sérieux.

Puisque Bankowski [6] a remarqué qu'une augmentation aiguë de l'incidence du coryza et ses succédanés (maladie respiratoire chronique?), aérosacculite, maladie de Newcastle, s'était produite en 1949, année où les vaccins à virus vivants atténués furent introduits dans l'industrie aviaire pour immuniser les animaux contre la maladie de Newcastle, on peut se demander quel rôle revient à ces virus ?

La vaccination par les virus vivants atténués semble préparer le terrain.

Corstvet et Sadler, en 1966 [18], ont constaté, par la méthode d'immuno-fluorescence que les lésions provoquées par les virus sur l'épithélium respiratoire permettent la culture du mycoplasme. En effet, dès que l'épithélium commence à cicatriser, la multiplication des mycoplasmes diminue.

Le virus de la laryngo-trachéite infectieuse aussi incriminé dans de nombreux pays n'a pas encore été isolé en France.

En réalité, les virus agissent rarement seuls. Ils sont, le plus souvent, associés aux mycoplasmes et aux bactéries, dont le colibacille.

C) Causes favorisantes.

Leur importance était déjà considérée il y a dix ans aux U.S.A., où l'on estimait classiquement que la M.R.C. était une maladie des grands effectifs surpeuplés, des locaux mal ventilés et qu'elle était un risque inhérent aux vaccinations.

Rappelons rapidement les différents facteurs qui peuvent intervenir :

1) *Influence du milieu.*

— *Température :*

Valeurs normales entre 15 et 20°C pour des adultes.

Une variation brusque vers de basses températures provoque une ischémie de tout l'appareil respiratoire et favorise l'action de quelconques micro-organismes.

Les variations vers des températures élevées accompagnées d'une forte humidité favorisent la multiplication des germes et agissent sur un organisme animal dont l'appareil respiratoire est surmené par une mauvaise adaptation physiologique à la chaleur.

— *Humidité relative de l'air :*

Elle doit être comprise entre 55 et 65 % à 13°C pour des adultes.

Insuffisante, elle dessique le système muco-ciliaire de l'appareil respiratoire qui ne peut plus jouer son rôle purificateur.

Trop forte, elle agit en synergie avec la température sur la viabilité des germes.

Toutefois, pour les humidités relatives supérieures à

85 %, le nombre de germes vivants est moindre. Ce phénomène demeure encore sans explication.

— *Pureté chimique de l'air :*

La concentration en oxygène doit être supérieure à 20 % et se rapprocher le plus possible de l'air pur.

La concentration en gaz délétères doit toujours être faible : inférieure à 0,5 % pour le gaz carbonique et inférieure à 70 ppm pour l'ammoniac, l'idéal se situant à 20 ppm.

Des valeurs supérieures à ces normes provoquent des lésions histologiques de la muqueuse pituitaire.

Dans les poulaillers à ventilation dynamique, la pureté chimique de l'air est totalement solidaire du système. Aussi, celui-ci doit-il respecter les normes suivantes :

— renouvellement en air frais :

1,5 à 2,5 m^3/kg de poids vif;

— vitesse de circulation de l'air :

0,5 à 0,8 m/s à 13-15°C,
0,8 à 1,8 m/s à 23-24°C.

Il va de soi que la moindre défaillance jouant sur l'apport d'oxygène et l'évacuation des gaz délétères a une incidence en rapport avec l'intensité de la défaillance et avec sa durée.

— *Pureté biologique de l'air :*

Il s'agit de la pollution biologique de l'air liée à la présence de micro-organismes qui proviennent des matières fécales et sont mis en suspension par l'agitation des animaux.

D'après Langmuir [35], ces micro-organismes sont : soit accrochés aux poussières, soit à des gouttelettes d'eau formant ainsi les gouttelettes de Flügge.

Ces particules vont bien sûr sédimenter et se déposer,

notamment sur les animaux. Les poussières infectées vont périodiquement être remises en suspension dans l'air, tandis que les gouttelettes de Flügge vont donner de grosses molécules qui vont sédimenter et des plus petites qui vont se dessécher, constituant les « droplet nuclei » (1 à 3 microns) et constituer ainsi un aérosol relativement stable.

Le Bars [36], étudiant ces points d'aérobiologie, a remarqué que le taux de mortalité des bactéries en suspension dans l'air croît globalement lorsque l'hygrométrie de l'environnement diminue et augmente de façon logarithmique avec un accroissement de température. Pour de fortes humidités relatives et de basses températures, la viabilité des germes est relativement bien conservée et ceci semble expliquer l'aggravation des maladies respiratoires dans de telles conditions climatiques.

L'importance de cette pollution biologique est donc loin d'être négligeable bien que viabilité et pouvoir infectant soient deux notions différentes et que toute cellule viable ne s'infecte pas.

Point n'est besoin de préciser la forte interdépendance de ces différents paramètres.

— *L'éclairement :*

La lumière agit de part les radiations qu'elle émet et par les aéro-ions qu'elle forme.

Le rôle germicide et virulicide des rayons ultra-violets est connu et le virus de la maladie de Newcastle est tué en moins d'une heure à la lumière solaire.

Les aéro-ions positifs provoquent des micro-fissures dans les muqueuses aériennes antérieures.

Par contre, les aéro-ions négatifs facilitent les échanges respiratoires et augmentent la résistance aux maladies infectieuses.

2) *Les stress.*

Ce mot intraduisible désigne l'action d'un agent « offensant » sur l'organisme, et les réactions de l'organisme contre cet agent. Il est employé pour désigner des agressions physiques et psychiques.

Dans les conditions d'élevage intensives, les stress sont nombreux et répétés.

— *Stress génétique :*

Dû à la sélection vers la productivité, il se traduit par un déséquilibre végétatif et endocrinien.

— *Stress alimentaire :*

Il est aussi bien lié à l'aspect quantitatif de l'alimentation en particulier les rationnements draconiens, qu'à l'aspect qualitatif où il faut noter les carences ou subcarences; parmi celles-ci, rappelons l'importance de la vitamine A dans l'intégrité des épithéliums.

Ce rôle de l'alimentation est bien explicité lors d'accès de maladie respiratoire simultané avec un changement brusque de formule alimentaire.

— *Conditions de vie :*

Brion [9] : « Le surpeuplement en déréglant la hiérarchie sociale est générateur de stress multiples dont il est possible de trouver les stigmates tant par l'anatomopathologie que par leurs modifications hormonales et sanguines. »

Le surpeuplement, les changements d'habitude dans le programme d'éclairement, les visites, les bruits, les manipulations intempestives, sont autant de causes néfastes à une bonne ambiance.

— *Les états morbides intercurrents :*

Parmi ces états les infections parasitaires à helminthes et protozoaires sont bien connues maintenant.

Les coccidioses notamment sont à surveiller et une thérapeutique anticoccidienne associée à de fortes doses de vitamines permet souvent d'atténuer l'incidence de la maladie respiratoire.

ÉPIZOOTIOLOGIE

— *Spécificité des mycoplasmes.*

Les deux souches de mycoplasmes pathogènes: *M. gallisepticum* chez le poulet et *M. meleagridis* chez le dindon sont spécifiques de l'espèce qu'ils infectent. Cependant, de nombreuses autres espèces d'oiseaux, de mammifères et l'homme ne sont pas exemptés de contamination mycoplasmique.

Jusqu'à maintenant les notions de race et de sexe n'interviennent pas.

— *Transmission horizontale des mycoplasmes.*

La transmission par contact a été expérimentalement démontrée chez le poulet axénique. Elle se réalise par une pénétration de l'agent infectant au niveau de la voie respiratoire, par contact d'animal malade à animal sain : expectoration de particules infectantes (gouttelettes de Flügge, aérosol) qui sont disséminées dans le milieu ambiant.

L'origine de ces mycoplasmes se situe au niveau des voies respiratoires d'animaux porteurs.

La voie digestive n'a aucun rôle dans la propagation de la maladie. Papageorgiou, Valette, Cherby et de Saint-Aubert [50] ont montré que la lipase pancréatique lysait les mycoplasmes.

In vitro, les mycoplasmes sont peu résistants, en particulier à la chaleur. Des températures de 30 à 60°C, les inactivent ou les détruisent assez rapidement. Ils sont

très sensibles aux ultra-violets; de plus ils sont sensibles à beaucoup d'antiseptiques.

On peut donc considérer que la survie des mycoplasmes dans le milieu extérieur est limitée et cette survie de contamination peu importante semble-t-il.

— *Transmission verticale.*

Les mycoplasmes pathogènes, *Mycoplasma gallisepticum* et *M. meleagridis*, ainsi que certains mycoplasmes saprophytes sont transmis par l'œuf. Calnek et Levine [13] ont reproduit expérimentalement cette transmission à partir d'œufs embryonnés de 5 jours inoculés avec une souche virulente de *Mycoplasma gallisepticum*.

Mycoplasma gallisepticum a été isolé de l'oviducte de poulettes infectées, jusqu'à 126 jours après une inoculation expérimentale, il a également été isolé du sperme de coquelets (Yoder et Hofstad, 1965 [69]).

Après contamination de l'oiseau par les mycoplasmes, une bactériémie variable s'installe vraisemblablement. Le passage à l'œuf semble se réaliser, non pas au niveau de la grappe ovarienne, mais par contamination de l'ovule au cours de sa migration intra-abdominale ou dans la portion infundibulaire de l'oviducte, par contact avec le sac aérien abdominal.

Roberts et Mc Daniel, en 1967 [55], ont précisé que l'embryon lui-même est infecté. En effet, ils ont pu isoler *Mycoplasma gallisepticum* du disque germinal d'œufs pondus par des poules inoculées.

Tournut, Redon et Lacaze [65] ont montré que cette contamination par l'œuf n'était pas systématique. Peut-être doit-on y voir le rôle du degré d'infection des sacs aériens postérieurs et l'ancienneté des lésions. Ainsi, les lésions anciennes des sacs aériens des pondeuses encore en activité génitale sont organisées, plus circonscrites, moins riches en mycoplasmes que les lésions aiguës.

L'extrême fréquence de l'infection des sacs aériens de pondeuses reproductrices, même en excellent état apparent et présentant de bonnes performances économiques, permet d'apprécier le rôle prédominant de cette voie de transmission dans l'épizootiologie de la maladie naturelle.

DIAGNOSTIC

1) Clinique.

Il repose essentiellement sur la toux, le jetage, les râles observés sur les sujets malades. L'âge des malades peut être un élément d'appoint intéressant, la mycoplasmose atteignant préférentiellement les oiseaux âgés de 4 à 8 semaines.

Si la mortalité est inexistante, la morbidité est importante.

2) Nécropsique.

Il est basé sur l'examen des cadavres et des lésions.

Macroscopiquement les autopsies des sujets malades révèlent des formations de pus épais et jaunâtre dans les sacs aériens, accompagnées fréquemment de périhépatite, de péritonite et de péricardite sérofibrineuses.

Au tout début de l'infection, on ne trouve qu'une inflammation des premières voies aériennes et une perte de la transparence des sacs aériens.

3) Expérimental.

Ce diagnostic est important dans l'étude expérimentale qui nous intéresse, car lui seul permet de juger l'efficacité du trempage des œufs.

Son rôle pratique a été bien exprimé par Brion [*in* 63] : « il ne s'agit en aucune façon de faire un diagnostic individuel d'infection, mais seulement un

diagnostic concernant l'existence de la mycoplasmose dans un effectif d'animaux âgés de plus de 3 semaines ».

a) *Diagnostic sur les animaux adultes :*

Les anticorps agglutinants apparaissent 10 à 15 jours après l'infection et le taux varie considérablement selon les animaux, les périodes sexuelles, l'évolution de la maladie et les traitements appliqués.

Trois séries de réactions :

— réactions sérologiques,

— cultures bactériologiques,

— inoculation à l'animal.

1) *Sérologie :*

Pour Cottereau [19], ce sont les réactions principales de la pratique courante. On doit opérer sur au moins cinq sérums d'animaux malades ou suspects, et dans un effectif, une fois sur la totalité de l'effectif, puis sur 1/10^{e} de l'effectif tous les deux mois.

Les réactions sont :

a) la réaction de séro-agglutination rapide sur lame;

b) la réaction d'hémo-agglutination rapide sur lame;

c) la réaction d'inhibition de l'hémagglutination;

d) la réaction d'inhibition de croissance [49, 51].

a) *Séro-agglutination rapide sur lame.*

C'est le test diagnostique le plus rapide et sa valeur ne dépend que du nombre de sérums examinés.

Les sérums stériles doivent être utilisés après un séjour de 24 h à + 4°C. L'emploi se fait à la température du laboratoire.

L'antigène à utiliser est le S 6 de Adler. C'est une suspension homogène de *Mycoplasma gallisepticum.*

On mélange une goutte de sérum et une goutte d'antigène. On agite et on observe l'agglutination en moins de 2 minutes à la température du laboratoire.

Seules les réactions positives sont significatives, car, à certaines périodes de la maladie, les sujets infectés n'ont pas d'agglutinines. Il ne faut donc pas déclarer indemnes les animaux ayant fourni une réaction négative.

b) *Hémo-agglutination rapide sur lame.*

On utilise le même protocole que pour la réaction précédente, mais avec une goutte de sang total prélevée à la crête ou à la veine alaire ; mais cette réaction est moins fidèle que la séro-agglutination qui doit toujours lui être préférée.

c) *Réaction d'inhibition de l'hémagglutination.*

C'est la méthode de Fahey et Crawley (1954) :

— *l'antigène* est l'antigène inactivé au formol de Crawley ;

— *sérum*, la technique nécessite 1 ml de sérum environ, limpide, dépourvu de toute hématie, stérile et conservé au réfrigérateur à + 4°C ;

— *révélateur*, on utilise une suspension de globules rouges de poulet à 3 % dans du sérum physiologique, après que ces globules aient été lavés dans du sérum physiologique et centrifugés à trois reprises.

— *Technique :*

On opère de préférence sur une plaque de lucite perforée de cupules tronconiques.

1) Dans la première cupule, à gauche, on place 0,8 ml de sérum et dans les autres 0,5 ml. Dans la première cupule, on ajoute 0,2 ml de sérum à examiner. On mélange. On prélève 0,5 ml du mélange et on le verse

dans la deuxième cupule. On procède de la même façon pour les cupules successives. On a ainsi des dilutions à 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160. Il est inutile d'aller au-delà.

On peut procéder de même avec le sérum de référence positif et le sérum négatif, pour disposer d'un étalonnage de comparaison.

2) Ajouter dans chaque dilution de sérum, 1 ml d'antigène reconstitué. Attendre 15 mn à la température du laboratoire.

3) Ajouter dans chaque cupule 0,5 ml de la suspension globulaire à 3 %. Laisser une heure à la température du laboratoire.

4) Lecture : Les sérums positifs fixent et inhibent l'agglutination des érythrocytes par l'antigène. Il n'y a donc pas en ce cas d'agglutination et les globules se disposent dans le fond de la cupule. La réaction type est donnée par le sérum positif témoin.

Si le sérum est négatif, il y a au contraire une agglutination qui est révélée par la présence d'agglomérats d'érythrocytes sur toute la surface de la cupule.

L'agglutination est partielle s'il y a à la fois des agglomérats et un dépôt au fond de la cupule.

La plus grande dilution de sérum donnant une inhibition complète de l'agglutination fournit la limite de l'épreuve.

Il est bon toutefois de faire une seconde lecture au bout de 24 heures, car on peut voir apparaître des agglomérats dans des cupules où l'on considérait après une heure la réaction comme positive.

On constate que les sérums positifs inhibent l'agglutination à des dilutions supérieures au 1/20 après une heure.

d) *Inhibition de croissance* [49, 51].

C'est une méthode de recherche des anticorps protecteurs. Elle n'est actuellement pas à envisager au stade du dépistage de la maladie.

2) *Culture du mycoplasme.*

En pratique cette méthode est difficile à réaliser; les cultures sont toujours très grêles et lentes (8 à 12 jours).

De plus, il faut des prélèvements peu souillés par des bactéries, car l'adjonction d'antibiotique en quantité suffisante pour inhiber les bactéries, empêche la culture du mycoplasme.

— *Prélèvements :*

On utilise le raclage de trachée de plusieurs sujets sacrifiés ou morts récemment.

— *Mise en culture :*

Ce prélèvement est mis en culture soit sur un milieu liquide, soit sur milieu gélosé, soit sur les deux.

Ces milieux ont été décrits lors de l'étude de la bactériologie des mycoplasmes.

Une atmosphère de CO_2 peut être favorable au départ de la culture.

Mettre à l'étuve à 37°C, 5 jours, en n'oubliant pas de fermer les boîtes avec un ruban adhésif.

Le milieu liquide n'étant pas troublé par la culture, il faut examiner une goutte au microscope après coloration au giemsa pour contrôler la présence des mycoplasmes. Ceux-ci se voient mieux sur les milieux gélosés.

— *Différenciation de M. gallisepticum et de M. gallinarum :*

1) *M. gallinarum* pousse plus vite. Les premières colonies sont visibles dès le 2^e jour. Le 7^e jour elles

apparaissent déjà avec un mamelon central, tandis que les cultures de *M. gallisepticum* sont à peine perceptibles à 3 jours, et nettement visibles à 5 jours seulement.

2) *M. gallisepticum* vu à la coloration de giemsa a toujours un aspect coccobacillaire.

3) Les colonies de *M. gallinarum* sont grosses, avec un mamelon central. Celles de *M. gallisepticum* sont toutes petites, fréquemment sans mamelon lors de l'isolement. *M. gallinarum* a des formes diverses, en anneau, en corps bipolaire.

Remarque :

Souvent, la première culture donne à la fois des bactéries et les deux types de mycoplasmes.

Repiquer alors une ou plusieurs colonies de *M. gallisepticum* repérées au microscope ou à la loupe, dans de nouveaux milieux auxquels on a ajouté de la pénicilline. Les repiquages se font tous les 5 jours. Lorsqu'on a des cultures pures de mycoplasmes, on peut différencier *M. gallisepticum* de *M. gallinarum* sur un milieu glucosé, lequel fermente en plus de 48 heures dans le premier cas et en moins de 48 heures dans le second.

Actuellement, la méthode par inhibition de croissance permet d'identifier les mycoplasmes selon leur composition antigénique.

3) *Inoculation à l'animal.*

On inocule au moins 6 poulets dont le sérum ne contient pas d'anticorps agglutinants. Cette inoculation se réalise par voie intra-nasale ou intra-trachéale à l'aide d'une seringue avec aiguille mousse à partir du produit de raclage de la trachée.

Les animaux maintenus dans des conditions strictes d'isolement sont observés pendant 3 semaines : la moitié du lot est sacrifié au bout de ces 21 jours d'observation

pour l'examen nécropsique et test de séro-agglutination.

En cas de résultat négatif, la même opération est effectuée sur le reste des animaux après 5 semaines d'observation.

Cette méthode, dont les résultats ne sont connus qu'après un temps assez long, lié à la durée de la période d'incubation des mycoplasmes, n'est donc à réserver que pour des cas particuliers.

b) *Embryo-diagnostics.*

Décrite par TAILLANDIER [63], cette technique repose sur l'examen systématique des sacs aériens thoraciques des sujets morts en coquille.

Si la mort de ces sujets est consécutive à la mycoplasmose, les sacs aériens thoraciques se montreront remplis d'un dépôt jaunâtre, parfois spumeux, souvent ferme. Ces dépôts ne devront pas être confondus avec la graisse, plus blanche, se trouvant normalement sur les bords du sac aérien.

La présence du dépôt jaunâtre d'un seul sac est caractéristique de la maladie.

Il est bon d'effectuer l'examen des sacs aériens d'au moins vingt poussins morts au bêchage à chaque éclosion de chaque parquet reproducteur, et ce, durant au moins trois semaines consécutives.

Cette méthode d'embryo-diagnostic permet de classer les unités reproductrices en rapport à leur taux d'infection mycoplasmique.

De plus, elle permet à la sortie de l'éclosion, une prévision relativement fidèle des éventuels accidents qui surviendront aux sujets éclos, compte tenu de leur destination et des méthodes d'élevage dont ils bénéficieront ou pâtiront.

Connaissant le taux d'embryons infectés, l'accouveur peut intervenir très précocement sur les parquets de reproducteurs contaminés, avant l'apparition d'éventuels signes cliniques, et décider de la mise en œuvre sur les poussins d'un plan de chimio-prévention, d'autant plus indispensable que les sujets seront issus d'un lot plus infecté.

Actuellement, c'est donc une méthode d'approche, relativement grossière, mais extrêmement précieuse dans la révélation du taux d'infection des reproducteurs.

PROPHYLAXIE

Brion et Fontaine en 1960 [11], Taillandier en 1968 [63], Tournut et Espinasse en 1969 [64], proposèrent des plans de prophylaxie pour lutter contre la mycoplasmose aviaire dont voici les principales mesures :
1° Mesures défensives :

Elles sont destinées à éviter l'apparition de la mycoplasmose dans un élevage indemne.

Brion et Fontaine [11] ont bien défini les sites d'intervention : « Il est nécessaire d'envisager les modalités destinées à la protection d'un élevage donné, applicables à l'échelon local et les modalités générales ayant pour but d'empêcher la création de foyers nouveaux et d'assurer la pérennité de l'état sanitaire des élevages sains. »

a) *A l'échelon particulier :*

Les modalités d'application sont liées aux principes généraux de la prophylaxie hygiénique.

L'élevage des poulets de chair se fera en lots séparés et isolés. Les parquets, les batteries et les systèmes d'aération-ventilation doivent être disposés rationnellement. Le contrôle de poussins nouvellement introduits est difficile. Seule la mise en évidence de mycoplasmes par culture permet de poser un diagnostic précis.

Chez les animaux reproducteurs, toute suspicion de mycoplasmose doit être accompagnée d'une recherche de l'agent étiologique et des anticorps spécifiques. La détec-

tion des agglutinines reste le meilleur moyen de contrôle sanitaire des animaux de repeuplement. De même, lors de l'introduction de nouveaux sujets dans l'élevage, une recherche des agglutinines par séro-agglutination ou par inhibition de l'hémagglutination témoigne ou non d'une infection. Le mieux est de pratiquer ces tests le jour de l'arrivée, puis un mois après.

b) *A l'échelon général :*

— *Importation.*

Les mesures visent à empêcher la création nouvelle de foyers de maladie sur l'ensemble du territoire. L'autorisation de commerce à travers les frontières est soumise, pour les importateurs français, à la délivrance préalable d'une licence d'importation devant entraîner la surveillance sanitaire des élevages importateurs. Une rigoureuse application de ces mesures permettrait d'atténuer l'incidence de la pénétration des sources d'infection d'origine étrangères, fréquentes actuellement.

— *Vaccins vivants avianisés.*

Selon Box [8], la fabrication des vaccins vivants par culture de virus sur œuf peut être souillée par des mycoplasmes présents dans les œufs utilisés. Un contrôle de stérilité de ces vaccins est donc indispensable.

— *Contrôle des élevages reproducteurs destinés au commerce des œufs et poussins.*

Organes de dissémination importants, un contrôle de ces élevages est nécessaire. Cependant, aucune mesure de législation sanitaire concernant ces élevages n'existe actuellement. Ainsi aucune garantie n'est offerte aux acheteurs qui éprouvent des difficultés à formuler un recours en raison de la lenteur du développement de la maladie et de la durée d'incubation des symptômes cliniques et des lésions.

2° Mesures offensives :

— *Traitement des reproducteurs.*

a) *Chimio-prévention :*

L'administration systématique de fortes doses d'antibiotiques aux reproducteurs, suggérée par Fahey et Crawley en 1954 [23], est une des premières méthodes prophylactiques qui aient été utilisées.

De nombreuses substances furent utilisées, parmi lesquelles on trouve surtout : la chlortétracycline, l'érythromycine, la spiramycine et la tylosine. On peut à longue échéance éliminer totalement l'infection des souches parentales.

En matière de pondeuses reproductrices, l'obtention des troupeaux dits « P.P.L.O.-Free » repose principalement sur cette méthode.

b) « *Infection contrôlée* » :

Mc Martin et Adler [38] ont remarqué que l'infection mycoplasmique du poulet s'accompagne d'un certain degré de prémunition, dont le mécanisme n'est pas connu.

Olson, Heishman et Shelton [45] ont utilisé cette immunité d'infection en effectuant l'inoculation faible et contrôlée d'une souche pathogène de *Mycoplasma gallisepticum* au poussin.

L'effet est favorable sur l'état sanitaire des animaux, qui résistent mieux aux maladies respiratoires, et sur les performances zootechniques. La transmission de Mycoplasma par l'œuf est également réduite, mais les anticorps élaborés par les animaux prémunis passent à leur descendance dans le vitellus.

Cette méthode ne peut aboutir à l'éradication de la mycoplasmose et elle a surtout l'inconvénient majeur de

disséminer le contage dans des troupeaux moins sensibles.

c) *Vaccination :*

Warren et al., en 1968 [67], ont préconisé un vaccin inactivé contre *Mycoplasma gallisepticum*, tandis que Kottaridis et al., en 1967 [34], et Papageorgiou, en 1970 [47], ont préféré atténuer une souche de *Mycoplasma gallisepticum* pour prémunir les animaux.

La souche vaccinante de Papageorgiou [48] ne provoque pas l'apparition d'agglutinines dans le sérum après l'intervention. Ces travaux laissent espérer la possibilité d'une vaccination efficace ne répandant pas la contagion.

— *Traitement des œufs.*

Nous avons vu lors de l'épizootiologie de la mycoplasmose cet important mode de transmission.

Une éradication par intervention au niveau de l'œuf : tel est l'objet de notre seconde partie.

DEUXIÈME PARTIE

LE TRAITEMENT DES ŒUFS A COUVER

LA COQUILLE DE L'ŒUF

Elle se compose de deux entités anatomiques :

— les membranes coquillères (partie interne) ;

— la couche calcifiée ou coquille vraie (partie externe).

Les membranes coquillères.

Elles sont au nombre de deux :

— l'interne ou « membrane de l'œuf », « membrana putaminis », entoure l'albumen. Elle est intimement liée à la membrane externe, excepté au niveau du gros pôle de l'œuf où ces deux membranes séparées limitent une cavité : la chambre à air;

— l'externe ou « membrane de la coquille », « membrana testac ». Sa surface externe comporte des fibres nombreuses qui, passant par les noyaux de la couche mamillaire, l'unissent fortement à la coquille vraie.

Ces deux membranes, constituées de kératine, ont une épaisseur totale variant entre 60 et 70 microns.

La couche calcifiée.

Elle aussi est en deux parties :

— la couche mamillaire : partie interne. Elle représente environ 1/3 de l'épaisseur de la coquille et est constituée de protubérances coniques, à pointes dirigées vers l'intérieur de l'œuf, dont les bases sont étroitement juxtaposées en une seule assise. Il existe au sommet de chaque protubérance un noyau « mamillaire », petite masse de protéines, qui assure la liaison coquille-membrane coquillère externe;

— la couche spongieuse: En réalité, elle est compacte et formée d'une trame de collagène ou « matrix » sur laquelle se sont déposés les carbonates et phosphates de calcium et de magnésium.

Lors de la décalcification par les acides, il reste cette matrix, qui prend alors un aspect spongieux. Cette couche est traversée par de très nombreux canaux microscopiques, disposés irrégulièrement. Elle constitue en outre la plus grande partie de la coquille.

La cuticule.

C'est une pellicule très mince de protéines d'épaisseur en général inférieure à 10 μ, déposée sur toute la surface de l'œuf, recouvrant également l'ouverture des pores.

Les pores.

De taille variable, les plus gros étant visibles à l'œil nu, ils sont distribués inégalement suivant les régions de l'œuf. Très nombreux au gros bout, leur densité décroît vers la pointe. Leur nombre total varie de 7 000 à 17 000. Mettant en communication les milieux internes de l'œuf avec l'extérieur, ils sont responsables des échanges gazeux entre l'embryon et l'atmosphère lors de l'incubation.

Selon Mongin et Lacassagne [42], les moyens modernes d'investigation, tels que les rayons X et la lumière polarisée, ont permis de voir la structure interne de la coquille. Selon ces auteurs, la couche mamillaire et la couche spongieuse ne sont pas distinctes mais forment un ensemble unique. La coquille est constituée de cristaux monolithiques de calcite qui s'étendent du mamelon jusqu'à la surface au travers des fibres de la matrice protéique. La distinction antérieure entre les couches était due à une différence de densité cristalline et à la présence dans la couche mamillaire de petites quantités de P et de Mg.

LE TRAITEMENT DES ŒUFS

Afin de diminuer le rôle de la transmission des mycoplasmes par l'œuf, certains auteurs ont envisagé d'intervenir directement au niveau de l'œuf à couver avec une antibiothérapie efficace.

Chalquest et Fabricant en 1959 [14], Levine et Fabricant en 1962 [37], Olson et al. en 1962 [44] envisagèrent les premiers de faire pénétrer des antibiotiques dans l'œuf en trempant des œufs chauds dans des solutions froides.

Actuellement les méthodes d'intervention se subdivisent ainsi :

— procédé par injection;

— procédé par trempage :
  avec différence de température,
  avec différence de pression;

— traitement des œufs par la chaleur.

Alls et al. [3] ont testé une méthode de traitement utilisant l'énergie ultra-sonique, mais elle n'a pas semblé donner des résultats encourageants.

1) Méthode par injection.

L'antibiotique actif est injecté dans la chambre à air de l'œuf embryonné de 7 à 10 jours, sous un volume d'environ 1 ml, la solution ayant été préalablement portée à la même température que l'œuf. Cette méthode nécessite la perforation de la coquille de l'œuf en cours d'incubation et son oblitération ultérieure à la paraffine. Il faut ainsi un personnel bien entraîné et un matériel assez

important pour disposer en permanence de seringues et d'aiguilles stériles.

Cette méthode est donc onéreuse et peu pratique, mais elle a l'avantage d'être sûre car l'on connaît la quantité d'antibiotique injectée et la dose choisie en assure l'efficacité.

Toutes ces critiques formulées nous montrent qu'un tel procédé n'est guère utilisé en dehors du stade expérimental.

2) Méthode par trempage.

Elle est aussi connue sous le nom anglais de dipping (bain).

a) *Procédé par différence de température :*

Les œufs, maintenus à une température variant entre 25°C et 30°C, sont trempés durant environ 15 mn dans une solution antibiotique à 4°C. Ce refroidissement diminue le volume de la chambre à air, et crée donc un vide partiel qui entraîne l'aspiration du liquide par les pores de la coquille. Mais ce procédé est aveugle et la quantité d'antibiotique absorbée par l'œuf est extrêmement variable, ce qui conduit à des résultats aléatoires.

Aussi cette méthode est-elle actuellement abandonnée au profit de la suivante que nous verrons plus en détails.

b) *Procédé par différence de pression :*

Son principe est le même que celui par différence de température. Seulement les œufs, après lavage et désinfection superficielle, sont immergés dans un bac contenant la solution antibiotique. L'ensemble est mis en communication avec une cloche à dépression d'où l'air est aspiré par un système de pompage. La dépression créée va diminuer le volume de la chambre à air de l'œuf et le rétablissement de la pression normale, après un temps

défini, engendre la pénétration de la solution antibiotique à l'intérieur de la chambre à air.

3) Traitement des œufs par la chaleur.

Cette méthode, décrite par Yoder en 1969 [68], est basée sur la sensibilité des mycoplasmes à la chaleur. Une température interne de l'œuf de 44,5°C (114°F) suffit sous certaines conditions à tuer les mycoplasmes.

On pratique cette intervention sur des œufs de 14 jours, mais le taux d'éclosion de ces œufs est inférieur de 8 à 10 % à celui des œufs témoins.

Ces différentes méthodes connues, nous avons opté, dans la pratique, pour le procédé de trempage par différence de pression. En effet, le trempage selon le procédé avec différence de température n'a pas, d'après Voeten [66], donné les résultats escomptés; car il estime que beaucoup trop d'œufs absorbent une quantité insuffisante d'antibiotique. Le procédé par la chaleur, lui, est de connaissance très récente.

LE LAVAGE - TREMPAGE

Voici le procédé tel que nous l'avons utilisé et tel qu'il nous a permis d'obtenir les résultats énoncés ultérieurement.

A) Le matériel.

Il comporte principalement deux machines : une machine à laver et une machine à tremper.

1) *La machine à laver :*

De type convoyeur à pulvérisation, sa capacité de traitement horaire est de 6 000 à 6 500 œufs. Elle comporte quatre postes différents : lavage, désinfection, rinçage et séchage.

— *Le lavage :*

La machine comprend un bac d'une capacité de 128 litres pour la solution détergente et des rampes de lavage situées au-dessus et au-dessous des œufs à nettoyer.

— *La désinfection :*

Elle est réalisée par deux gicleurs qui aspergent les œufs immédiatement après le lavage d'une solution désinfectante contenue dans un récipient indépendant de 15 litres.

— *Le rinçage :*

Il est effectué par une rampe à pulvérisation.

— *Le séchage :*

Les œufs sont séchés par un puissant ventilateur.

En ce qui concerne les solutions de lavage et de désinfection : la solution détergente est recyclée, tandis que la solution désinfectante ne l'est pas.

2) *La machine à tremper :*

Elle est constituée d'une série de marmites reliées à une pompe à vide. A chaque trempage cette pompe permet de pratiquer une dépression de 0,38 atmosphère durant 5 mn. Dans chaque marmite prennent place deux bacs en acier inoxydable destinés à recevoir les paniers spéciaux, contenant les alvéoles remplies d'œufs, et la solution d'antibiotique.

A ces deux pièces maîtresses, il convient d'ajouter :

— *un filtre Seitz* qui sert à purifier les solutions antibiotiques avant et après chaque trempage;

— *une pompe en acier inoxydable* indispensable pour l'utilisation du filtre et pour le transvasement de la solution antibiotique du bac de conservation aux bacs de trempage et réciproquement;

— *un générateur de vapeur* utile pour la désinfection du filtre Seitz avant les opérations de filtration:

— *des alvéoles*, en matière plastique; elles sont conçues de façon à ce que les œufs soient aussi lavés par la rampe inférieure. Les paniers à alvéoles, eux, sont en acier inoxydable ou en plastique et peuvent contenir 5 ou 6 unités.

B) Les solutions.

1) *Le détergent.*

— *Propriétés physiques et chimiques :*

Le détergent employé dans nos expérimentations est celui utilisé dans les centres de trempage hollandais.

Sa composition donnée par le fabricant est la suivante :

hypochlorite de soude.....	32 %
phosphate disodique.....	30 %
tripolyphosphate.....	21 %
soude.....	5 %
humidité.....	12 %

C'est un produit pulvérulent soluble dans l'eau. La présence d'hypochlorite de soude lui confère aussi des propriétés désinfectantes. Les neutralisants qu'il contient (tripolyphosphate et phosphate disodique) maintiennent une alcalinité (pH = 11 dans une solution de 1 % à 75°C) favorable au nettoyage. En dilatant les pores, cette alcalinité favorise aussi la pénétration des désinfectants et des antibiotiques dans les milieux internes de l'œuf. Il ne mousse pas dans les conditions normales d'emploi.

Il n'attaque pas l'acier, l'étain, l'aluminium et leurs alliages.

Il n'altère pas le caoutchouc et la plupart des matières plastiques.

Il est d'une bonne stabilité qui favorise le stockage et la durée d'utilisation.

A la suite des expériences effectuées, aucune toxicité de ce produit n'a été remarquée.

— *Modalités d'emploi :*

L'adjonction de produits chlorés dans l'eau doit conduire à une solution contenant 50 à 60 ppm de chlore actif.

Si l'on atteint un taux de 75 ppm, on obtient une décoloration des œufs.

Cependant, la présence d'eau chaude et ferrugineuse et de matières organiques libère rapidement le chlore et il convient d'enrichir la solution en cours de lavage ou de la renouveler fréquemment.

2) *Le désinfectant.*

L'emploi des ammoniums quaternaires est ici pratiquement impossible, car la présence d'œufs cassés produit une masse gommeuse qui bouche les canalisations.

Aussi, avons-nous préféré un sulfamide : la chloramine T (le produit commercial employé en contient 99,5 %).

Formule: Para-toluène - sulfamide monochloré et sodé (inscrit au tableau C).

— *Caractères :*

C'est une poudre cristallisée blanche, à peu près incolore, soluble dans l'eau (15 %) en donnant une solution légèrement alcaline. A l'état solide, elle se conserve très longtemps, mais les solutions sont altérables à la lumière et se décomposent à la chaleur.

— *Propriétés :*

Elles sont dues au chlore. Celui-ci se libère lentement pour donner l'ion hypochloreux ClO^- et des hypochlorites. On retrouve donc les propriétés antiseptiques, désinfectantes et désodorisantes puissantes du chlore et des hypochlorites.

La chloramine T n'est pas irritante.

— *Spectre d'action :*

La chloramine T est active contre les bactéries et les champignons. Elle inactive aussi certains virus.

— *Doses d'emploi :*

400 g pour 100 litres d'eau, soit 60 g pour le réservoir de 15 litres.

— *Détermination du pouvoir désinfectant :*

Le détergent et le désinfectant employés pour le lavage des œufs sont tous les deux chlorés. Comme l'eau de lavage est recyclée, nous avons cherché à déterminer le taux du

chlore actif de la solution en fonction du temps, pour connaître l'usure des solutions de lavage.

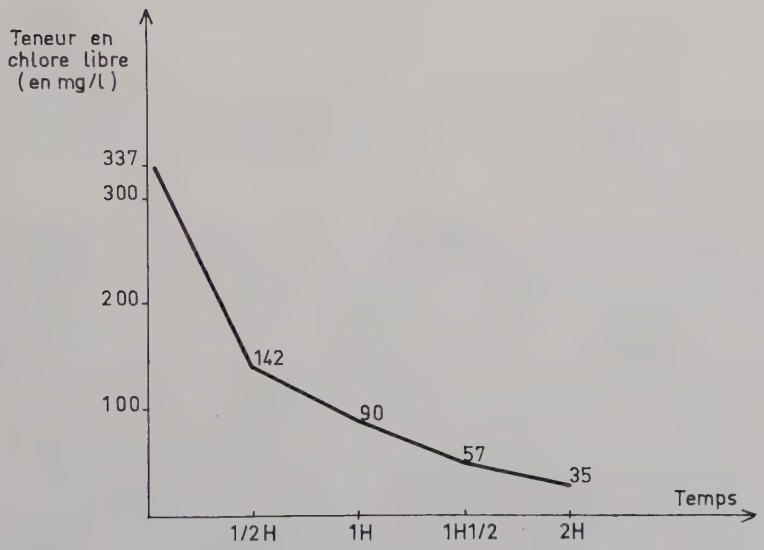
La méthode de titrage employée est celle au thiosulfate de sodium.

Le pourcentage de chlore actif de la solution est donné par la formule :

$$x\ (\%) = \frac{n \times 0{,}3546}{p}$$

dans laquelle (n) est le nombre de cm^3 utilisés de la solution de thiosulfate 4/10 et p le poids du prélèvement de la solution à titrer.

Nous avons ainsi obtenu la courbe suivante :



La teneur en chlore actif baisse donc très rapidement au début du lavage et si la solution n'est pas enrichie en permanence, un renouvellement toutes les deux heures s'impose pour ne pas atteindre un taux trop faible de chlore.

Mountney et Carol Day [*in* 5] ont remarqué que la flore microbienne des eaux de lavage chlorées augmente très rapidement en deux heures, puis atteint un plafond vers la 6e, 8e heure; même avec des solutions enrichies en cours de travail.

3) *L'antibiotique.*

Les mycoplasmes ne sont sensibles qu'à très peu d'antibiotiques. *In vitro*, ils présentent une résistance très nette vis-à-vis: des sulfamides, de la pénicilline, de la bacitracine, de la polymyxine et de l'oléandomycine. L'érythromycine et la spiramycine ont une action irrégulière selon les souches.

La streptomycine est active d'emblée, mais son action est très vite annulée par l'apparition rapide de mutants résistants.

Par contre, la sensibilité est très grande vis-à-vis du groupe des tétracyclines, qui sont actives à très faible dose, de la tylosine et de la kanamycine.

Dans le cadre de l'inoculation ou du trempage des œufs, les antibiotiques les plus étudiés furent :

— l'érythromycine (Stuart et Bruins, 1963 [61]; Alls et al., 1963 [2]);

— la spiramycine (Hall et al., 1963 [27]; Inglis et Jones, 1966 [32]);

— la chlortétracycline (Olesiuk, Van Roeckel et Chandiramani, 1965 [43]);

— la tylosine (Levine et Fabricant, 1962 [37], Olesiuk et al., 1965 [43]; Yoder et al., 1965 [69]).

Préalablement à tout choix, nous avons testé quelques drogues par inoculation à des œufs embryonnés de 11 jours et dénombrement des poussins vivants à l'éclosion.

Voici quelques résultats d'expériences effectuées sur des lots de 30 à 40 œufs :

ANTIBIOTIQUE	POSOLOGIE	% ANIMAUX VIVANTS A L'ÉCLOSION
Témoin.	0	90,00
Pénicilline.	20 000 U.I.	86,30
Dihydrostreptomycine.	1 mg	31,40
	2 mg	22,80
	4 mg	0,00
Témoin.	0	93,75
Tylosine.	1 mg	93,75
	2 mg	81,25
	5 mg	0,00
Témoin.	0	100,00
Colimycine.	2 000 U.I.	94,10
	5 000 U.I.	94,10
	10 000 U.I.	88,00
Témoin.	0	100,00
Tylosine + colimycine	2 mg + 5 000 U.I.	83,30
Témoin.	0	100,00
Colimycine + pénicilline.	2 000 U.I. ââ	94,10
	5 000 U.I. ââ	94,10
	10 000 U.I. ââ	88,00

Certains antibiotiques ne sont donc pas sans toxicité pour l'embryon. Le respect d'une posologie stricte est impérieux, sous peine d'atteindre rapidement une dose léthale à 100 %.

En pratique, nous avons utilisé le tartrate de tylosine à la concentration de 100 g de produit pur pour 40 litres

d'eau déminéralisée ou distillée afin d'éviter l'apport d'ions métalliques dans la solution de trempage.

C) Technologie du lavage - trempage.

Les œufs utilisés pour cette opération sont récoltés et stockés dans les conditions de la pratique courante des éleveurs.

Les alvéoles sont en matière plastique. Elles sont largement fenêtrées, afin de permettre une bonne aspiration de l'ensemble de la coquille lors du lavage.

1) *Lavage :*

Les alvéoles sont placées manuellement sur un convoyeur à chaîne. Le cheminement du convoyeur est très lent et la durée de l'opération atteint 7 minutes.

Il existe un gradient croissant de température suivant les postes successifs. La température de lavage est de 37,8°C (100°F), celle du rinçage de 43,3°C (110°F) et celle de la désinfection est intermédiaire. Tout ceci afin d'éviter une pénétration de germes indésirables par aspiration à travers la coquille.

Sur la machine employée, le lavage se fait en continu par l'intermédiaire de rampes disposées dans de multiples directions, mais il n'y a pas de pulvérisation sous les alvéoles ajourées. La pression de pulvérisation est de 2,5 kg.

Ensuite viennent la désinfection, le rinçage et le séchage toujours sur la même chaîne convoyeuse et tels qu'ils sont décrits dans le paragraphe 2 « matériel ».

A la sortie du séchage, une seconde personne rassemble les alvéoles pour procéder au trempage qui s'effectue aussitôt après.

2) *Trempage :*

Les alvéoles sont disposées dans des paniers métalliques adaptables aux bacs de trempage. Le déroulement de ces opérations s'effectue évidemment sans aucun contact manuel direct avec les œufs. Ceux-ci immergés dans la solution de tylosine vont subir successivement :

— une dépression amenant la pression finale à 0,380 atmosphère. Sa durée est de 5 mn;

— un retour à la pression normale, durée 10 mn.

3) *Conservation des solutions antibiotiques et entretien du matériel :*

La solution de tylosine est stérilisée par filtration avant et après toute opération de trempage. Elle est conservée dans des bacs en matière plastique désinfectés, placés dans un local à 12°C. Lors d'une opération de longue durée temporelle, la solution antibiotique est filtrée toutes les 4 heures afin d'éviter toute prolifération microbienne indésirable, à l'aide du filtre Seitz.

Le matériel est systématiquement désinfecté (vapeur, formol, chloramine T,...) avant et après chaque opération.

EFFETS ET RÉSULTATS DU LAVAGE - TREMPAGE

Eliminons immédiatement la casse en cours de traitement.

Deux contrôles furent effectués :

— le premier sur un total de 32 667 œufs, révèla 0,55 % de déchet et le second 0,66 % sur 153 782 œufs.

La majeure partie de la casse se situe au cours des manipulations des piles d'alvéoles; opération délicate en raison de la souplesse des alvéoles en matière plastique.

La pression de lavage n'a qu'une responsabilité limitée. Le pourcentage d'œufs cassés au cours de cette opération est très bas, mais il suffit d'un œuf cassé pour provoquer la formation immédiate et importante de mousse qui déborde largement dans la salle de lavage.

I. Effet du lavage.

1° *Effet sur la coquille :*

Simons et Wiertz [*in* 5], qui ont étudié la structure fine de la cuticule et son comportement au nettoyage, ont noté que le lavage sous un mince filet d'eau, à la main ou à l'aide d'un chiffon, n'apporte pas de modifications apparentes de la surface cuticulaire car aucun des composants ne disparaît. De même, le séjour de l'œuf dans de l'eau à 40°C pendant 5 minutes ne provoque aucune modification de la cuticule. Il faut dépasser cette température ou ajouter un détergent pour obtenir sa dissolution.

Les résultats d'éclosion que nous avons enregistrés se

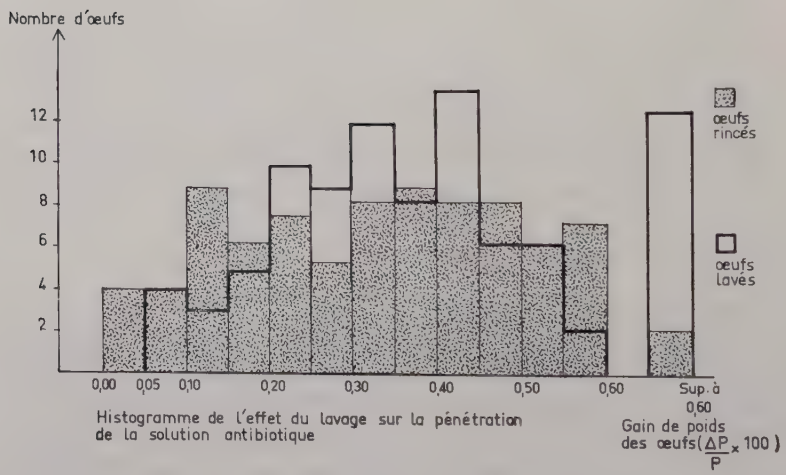
trouvent dans le tableau de comparaison : œufs lavés avec œufs lavés et trempés.

Le lavage a aussi une conséquence sur des pores de la coquille. Ceci est dû, nous l'avons vu, à l'alcalinité de la solution détergente. Cet effet a pu être mesuré par une expérience simple :

— pour un premier lot, les œufs ont été uniquement rincés à l'eau et trempés dans la solution antibiotique;

— pour le deuxième lot, ils ont été lavés (détergent et désinfectant) puis trempés.

Les résultats figurent sur le tableau suivant :



Histogramme de l'effet du lavage sur la pénétration de la solution antibiotique

Chaque lot d'expérience comprenait 90 œufs. La quantité d'œufs absorbant moins de 0,10 g de solution antibiotique est de 26 pour le lot rincé contre 8 pour le lot lavé.

Globalement, le gain de poids est le suivant :

— 0,189 g pour les œufs rincés,

— 0,227 g pour les œufs lavés.

2° *Usure de la solution de lavage :*

Toujours sur le plan pondéral, nous avons voulu préciser l'effet du lavage avec une solution usée.

Premier lot (120 œufs) : lavage avec une solution détergente neuve;

Deuxième lot (114 œufs) : lavage avec la même solution usée, par emploi sur 3 300 œufs.

Pour le lot n° 1, le gain de poids par œuf a été de 0,52 g, alors qu'il ne fut que de 0,43 g pour le lot n° 2.

Pour obtenir une bonne pénétration de la solution antibiotique dans l'œuf, il est donc nécessaire de renouveler fréquemment la solution de lavage.

3° *Contamination de la coquille :*

Des prélèvements effectués sur la coquille de l'œuf avant et après lavage, puis après trempage, nous ont fourni les résultats quantitatifs suivants :

— avant lavage, et dans 50 % des cas, il est impossible de dénombrer les colonies bactériennes;

— après lavage ou trempage, le nombre de colonies, dans tous les cas, descend à une valeur voisine de zéro.

Ceci confirme les résultats de Büchli [*in* 5] qui a remarqué que le lavage réduisait le nombre de bactéries de la coquille (flore totale aérobie) de 3.10^4 à environ 50 par coquille.

II. Effet du trempage.

L'appréciation directe a été faite par la mesure des différences pondérales avant et après l'opération.

Dans le procédé par injection, la quantité de tylosine utilisée est de 2 mg pour un œuf embryonné de 10 à 12 jours.

Absorption par l'œuf :

Dans l'ensemble de nos expériences, la moyenne d'absorption par œuf a été de 0,162 g, c'est-à-dire 0,4 mg de tartrate de tylosine.

Cette moyenne a été obtenue sur un nombre total de 1 240 œufs ayant de 0 à 7 jours d'incubation et provenant de souches expérimentales diverses.

Résultats de couvoir :

Afin de déterminer l'effet du lavage et l'effet du lavage et du trempage sur l'éclosabilité et sur la viabilité des poussins, nous avons mis en incubation et fait éclore, dans les mêmes conditions expérimentales, trois lots :

— lot 1 : œufs lavés;

— lot 2 : œufs lavés et trempés;

— lot 3 : témoin.

Voici les résultats :

	MEI	CASSÉS	CLAIRS	M1	M2	ÉCLOS	ÉLIMINÉS	VIABLES
Œufs lavés. . . .	3 361	1,16 %	25,59 %	7,71 %	3,30 %	62,04 %	2,53 %	59,51 %
Œufs lavés et trempés.	3 186	1,29 %	25,67 %	6,18 %	4,90 %	61,77 %	3,70 %	58,07 %
Témoin.	8 230	0,98 %	21,52 %	6,34 %	7,61 %	63,41 %	6,04 %	57,38 %

MEI = mise en incubation.

M1 = mirage à 5 jours.

M2 = mirage à 18 jours.

Remarquons que le pourcentage d'œufs clairs est supérieur de 4 % environ pour les lots lavés et lavés trempés par rapport au témoin. Il n'est donc pas surprenant d'avoir, pour celui-ci, un taux d'éclosion meilleur malgré un pourcentage élevé de morts au deuxième mirage.

Le pourcentage de casse est légèrement supérieur pour les œufs lavés et lavés trempés, conséquence des manipulations.

Dans le lot témoin, beaucoup de poussins furent éliminés, par rapport aux autres lots.

Le meilleur pourcentage de poussins commercialisables revient au lot lavé et le moins bon au témoin.

Il semble donc que le lavage et, mais un peu moins, le lavage-trempage augmentent le pourcentage de viabilité des poussins à la naissance.

III. Rôle de l'œuf.

Afin de déterminer l'influence de l'œuf par sa conformation, son âge et sa taille, nous avons conduit plusieurs séries d'expériences dans cette direction.

1) *Effet souche :*

Sauter et Petersen [56] ont déterminé l'effet de la densité de la coquille sur la pénétration microbienne à l'intérieur de l'œuf. Ils ont ainsi montré que, plus le poids spécifique de la coquille était élevé, meilleure était la protection envers la contamination extérieure.

De même, la résistance à la casse est proportionnelle à la densité de la coquille.

Les sélectionneurs, actuellement, travaillent à augmenter la résistance de la coquille.

L'expérimentation étant menée dans une station de

génétique aviaire, il nous était facile d'obtenir des œufs de souches pures différentes.

Nous avons pris trois souches :

— la souche n° 1 qui donne des œufs roux,

— la souche n° 2 qui donne des œufs moins colorés,

— la souche n° 3 qui donne des œufs blancs.

Dans le tableau suivant se trouvent mis en parallèle la casse réelle (en batterie et au sol) et le gain de poids des œufs après lavage-trempage.

	% DE CASSE RÉELLE		POIDS MOYEN DE L'ŒUF	POIDS MOYEN ABSORBÉ	$\frac{\triangle P}{P} \times 100$ MOYEN
	Batterie	*Sol*			
Souche n° 1.	15,30	2,95	60,24 g	0,161 g	0,266
Souche n° 2.	11,34	0,69	61,14 g	0,172 g	0,281
Souche n° 3.	6,12	0,61	62,75 g	0,170 g	0,270

Contrairement à ce que l'on aurait pu attendre, ce sont les catégories d'œufs fragiles qui possèdent le plus fort pourcentage d'œufs absorbant peu de solution.

Dans ce cas précis, nous n'avons pu mettre en évidence de corrélation entre la fragilité et la porosité.

2) *Age des œufs :*

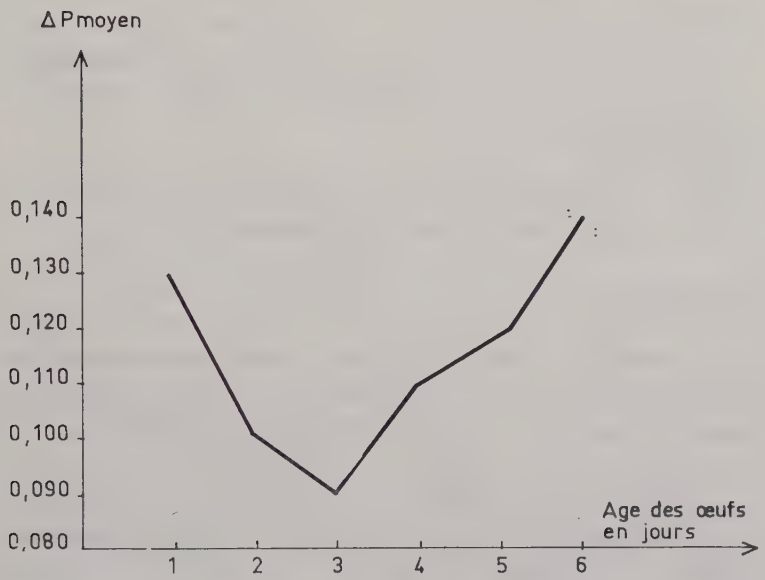
Selon SIMONS et WIERTZ [*in* 5], la surface cuticulaire devient plus lisse et plus compacte au fur et à mesure du vieillissement.

Cette modification se produirait de l'extérieur vers l'intérieur.

HAMMERLE [28] a bien montré dans ses études sur la résistance de la coquille des œufs que le vieillissement de l'œuf affectait cette résistance.

VOETEN [66], lui, trouve que les œufs absorbant le plus de solution de tylosine sont les œufs les plus âgés.

Nous avons refait ces expériences, dans les conditions décrites par VOETEN [66], en prenant les œufs de la souche n° 1, conservés dans des conditions de température et d'hygrométrie constantes.



Le graphique ci-dessus nous montre donc que le taux d'absorption n'augmente pas avec le temps, mais passe, au contraire, par un minimum le 3e jour après la ponte.

Le taux d'absorption des œufs diminuera donc les trois premiers jours, pour augmenter ensuite.

3) *Taille des œufs :*

Des expériences entreprises avec des œufs de calibres différents n'ont pas permis de mettre en évidence une

corrélation entre la taille des œufs et leur taux d'absorption.

4) *Conservation des œufs trempés :*

Afin de déterminer le meilleur moment auquel il convenait de mettre les œufs à incuber, nous avons stocké des œufs 24 heures et 96 heures avant la mise en incubation.

Les 6 203 œufs stockés 24 heures ont donné un taux d'éclosion de 72,6 %, tandis que ceux stockés 96 heures n'ont donné que 62,0 %.

Il n'y a donc pas intérêt à conserver longtemps les œufs trempés avant la mise en incubation.

IV. Résultats.

Les troupeaux issus d'œufs lavés-trempés ont été suivis systématiquement et périodiquement, ce qui nous a permis de mettre en évidence les résultats suivants :

1) *Embryo-diagnostics :*

L'examen des sacs aériens a été systématiquement pratiqué sur les poussins morts ou éliminés à l'éclosion et en particulier sur les poussins morts en coquille (œufs béchés non éclos).

	POUSSINS +	ŒUFS BÉCHÉS NON ÉCLOS +	TOTAL +
Œufs lavés et trempés..	8,64 %	18,03 %	11,21 %
Témoin.	11,80 %	18,18 %	13,69 %

Le tableau ci-dessus montre que le pourcentage des embryo-diagnostics positifs est inférieur sur les poussins issus d'œufs lavés et trempés par rapport au témoin.

La recherche de l'agent étiologique n'a pas été pratiquée.

2) *Cinétique des anticorps agglutinants :*

La recherche des agglutinines a été faite par hémo ou séro-agglutination en utilisant les antigènes Nobilis ou Wellcome du commerce.

a) *Animaux de 0 à 3 semaines :*

Tous les animaux à la naissance, qu'ils proviennent d'œufs lavés et trempés ou d'œufs témoins, héritent des agglutinines maternelles et sont positifs à 100 %.

Si les animaux sont élevés dans un milieu protégé, ces anticorps persistent pendant la première semaine pour disparaître durant la seconde. Tous les animaux du lot trempé sont devenus négatifs vers le 15e jour.

Un élevage dans un milieu exempt de mycoplasmose devrait permettre à ces animaux de rester indemnes de cette maladie.

b) *Au-delà de 3 semaines :*

Les poussins issus d'œufs trempés ont été élevés dans des élevages atteints de mycoplasmose et ont été comparés avec des poussins témoins des mêmes élevages.

Le tableau ci-dessous contient ces résultats globaux de recherche des anticorps agglutinants pratiqués sur 2 768 animaux d'une centaine de parquets différents.

	ŒUFS LAVÉS TREMPÉS		ŒUFS LAVÉS		TÉMOINS	
	Nbre de sujets	% de positifs	Nbre de sujets	% de positifs	Nbre de sujets	% de positifs
4- 8 sem. . .	120	0,00	314	11,46	299	3,68
8-15 sem. . .	779	12,45	90	46,67	390	38,46
6-45 sem. . .	275	41,09	—	—	501	84,63

Les poussins provenant d'œufs trempés restent négatifs jusqu'à 8 semaines. La réaction se positive par la suite, mais même à l'âge adulte, le pourcentage moyen de sujets positifs reste inférieur à celui du lot témoin.

Le lavage n'améliore en rien la contamination mycoplasmique.

3) *Viabilité :*

Les résultats d'autopsie effectués sur les poussins ont montré que la mortalité par infection vitelline avait pratiquement disparu dans les lots traités.

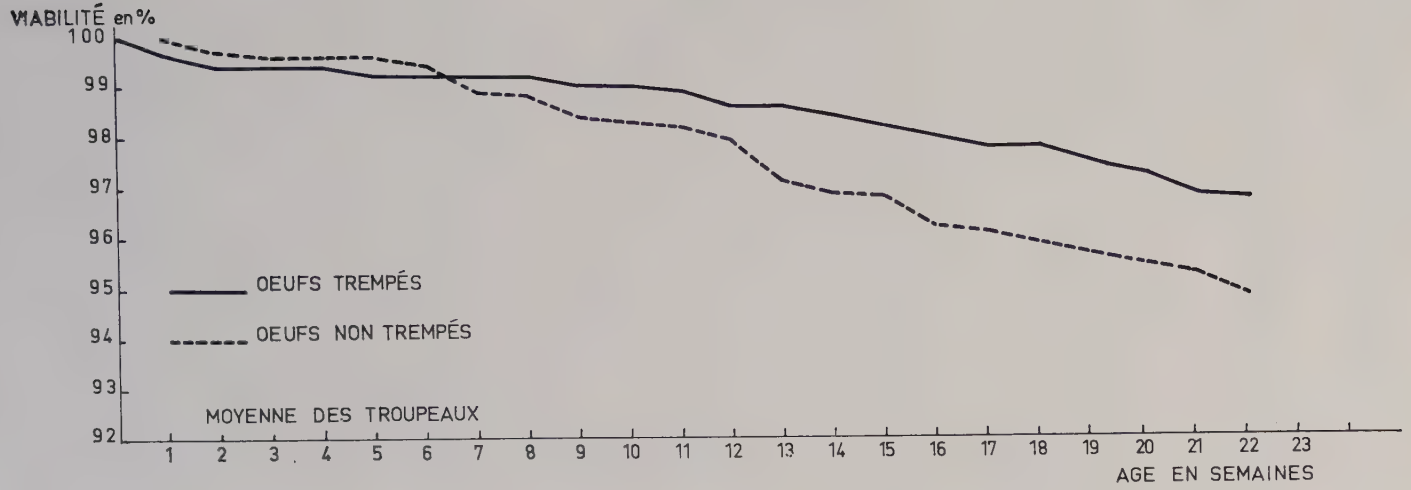
Sur le graphique suivant, nous voyons le cumul de mortalité de neuf élevages différents, qui ont exploité la même souche ponte, dans les mêmes conditions d'élevage.

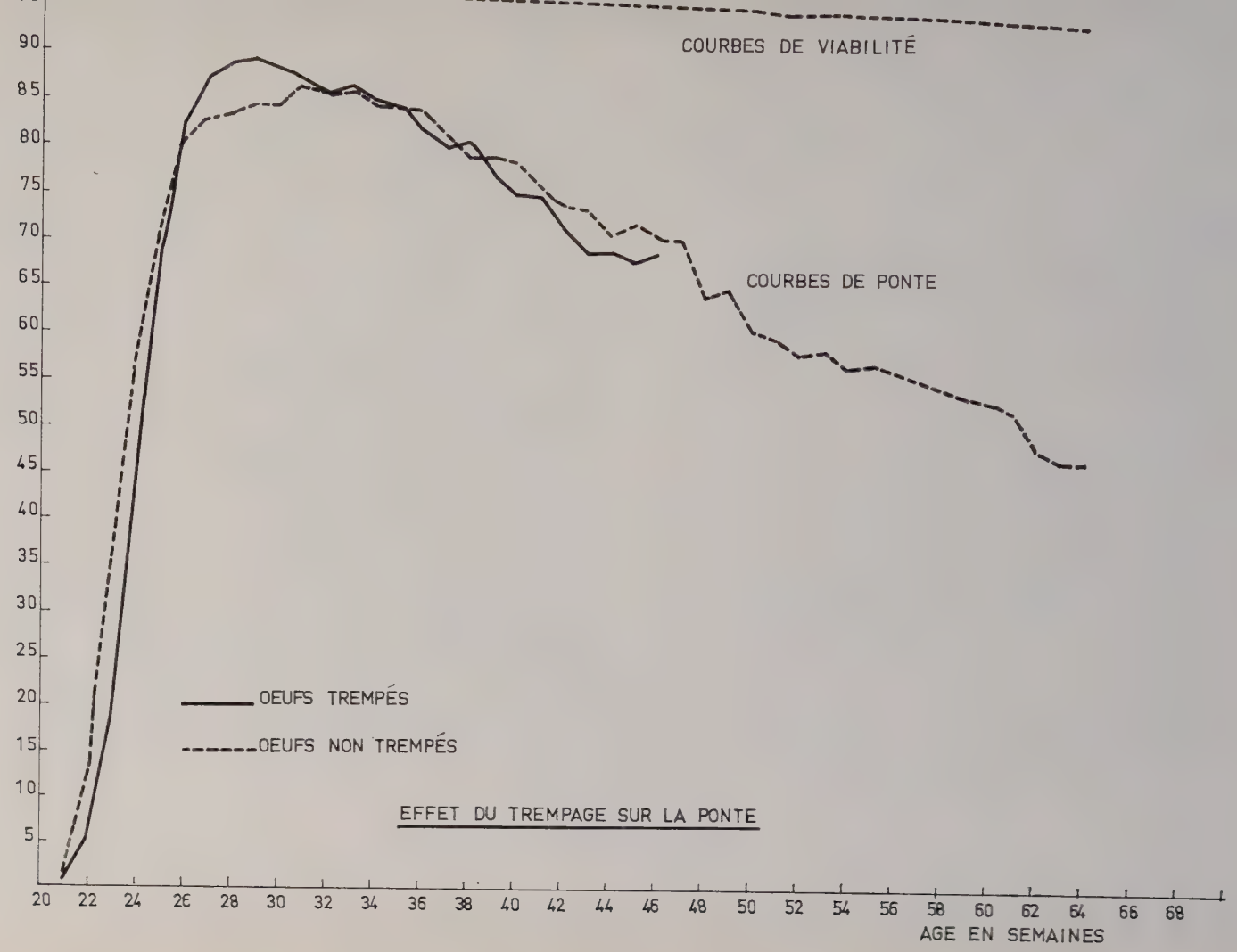
En règle générale, nous avons remarqué que les courbes de viabilité sont meilleures pour les lots provenant d'œufs trempés, mais la différence relevée sur les animaux jeunes a tendance à s'estomper avec le vieillissement des animaux.

4) *Effet sur la croissance :*

Voici les résultats de pesées effectuées à 28 jours. L'importance des lots est d'environ 400 animaux.

LOT / MOYENNE DES POIDS (g)	LAVÉS ET TREMPÉS	TÉMOINS
Lot n° 1.....	326	285
Lot n° 2.....	291	226
Lot n° 3.....	316	280
Lot n° 4.....	332	324
Moyennes.....	316,25	278,75


VIABILITÉ en %
100
99
98
97
96
95
94
93
92
OEUFS TREMPÉS
OEUFS NON TREMPÉS
MOYENNE DES TROUPEAUX
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23
AGE EN SEMAINES


COURBES DE VIABILITÉ
COURBES DE PONTE
OEUFS TREMPÉS
OEUFS NON TREMPÉS
EFFET DU TREMPAGE SUR LA PONTE
AGE EN SEMAINES

Le levage et le trempage des œufs a donc une action bénéfique nette sur la vitesse de croissance des animaux durant le premier mois de leur vie.

Il est actuellement impossible de donner les résultats ultérieurs car cette expérience a été entreprise il y a trop peu de temps.

5) *Effet sur la ponte :*

Dans tous les cas et comme le montre le graphique ci-après, les clochers de ponte sont meilleurs pour les lots provenant d'œufs traités et leurs courbes sont plus régulières dans le détail, que celles des témoins.

Cependant, les courbes des deux lots se rejoignent vers la 30^{e} ou la 40^{e} semaine, ce qui correpond logiquement à l'installation d'une recontamination révélée par l'apparition des agglutinines.

CONCLUSION

L'éradication de la mycoplasmose des volailles semble le seul moyen acceptable par l'élevage moderne pour faire disparaître les pertes économiques qu'elle entraîne.

L'élimination des autres éléments étiologiques de la maladie respiratoire chronique peut être concomitante de celle des mycoplasmes.

Le traitement des œufs à couver, en diminuant l'importance de la transmission verticale de cette maladie, se présente comme une des méthodes d'appoint pour l'obtention d'effectifs d'animaux à contamination de départ réduite.

Ainsi, en plus de ses effets sur les performances zootechniques des animaux, elle peut, dans l'aveni, servir de méthode transitoire et d'appoint à l'obtention des animaux orthoxéniques.

Vu : *Le Directeur de l'Ecole Vétérinaire,*
R. FLORIO.

Vu : *Le Président de la Thèse,*
MONNIER.

Vu : *Le Professeur de l'Ecole Vétérinaire,*
Rapporteur,
J. TOURNUT.

Vu et permis d'imprimer :
Toulouse, le 3 janvier 1972.
Le Président de l'Université Paul-Sabatier,
L. LARENG.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Adler (H.E.). — Mycoplasmosis in animals. *Adv. Vet. Sci.*, 1965, *10*, 205-244.

[2] Alls (A.A.), Benton (W.J.), Krauss (W.C.) and Cover (M.S.). — The mechanics of treating hatching eggs for disease prevention. *Avian Dis.*, 1963, *7*, 1, 89-97.

[3] Alls (A.A.), Benton (W.J.), Krauss (W.C.) and Cover (M.S.). — Treatment of hatching eggs for disease prevention : application of ultrasonic energy. *Avian Dis.*, 1964, *8*, 4, 538-545.

[4] Aycardi (J.) et Lafont (J.P.). — Données récentes sur l'étiologie et l'épizootiologie de la mycoplasmose du poulet. Conséquences prophylactiques. XXXVII[e] Session générale du Comité de l'O.I.E., 1969, rapport n° 208.

[5] Balençon (M.). — Lavage, désinfection, trempage des œufs à couver. Documents I.T.A.V.I., numéro spécial, septembre 1971.

[6] Bankowski (R.A.). — Respiratory disease complex of chickens in the United States. *Brit. Vet. Jour.*, 1961, *117*, 306.

[7] Beckmann (J.R.), Dunlop (W.R.) and Staples (W.). — Observations in the prevention of the C.R.D. complex. *Poult. Sci.*, 1959, *38*, 807-816.

[8] Box (P.G.). — Newcastle Disease. *The Vet. Rec.*, 1967, *81*, 27, clinical suplement n° 13.

[9] Brion (A.). — Surpeuplement des locaux en pathologie aviaire. *Revue de l'Elevage*, 1967, 129.

[10] Brion (A.) et Fontaine (M.). — La maladie respiratoire chronique. *Cahiers de Médecine Vétérinaire*, 1958, *27*, 2.

[11] Brion (A.) et Fontaine (M.). — Proposition d'un plan de prophylaxie de la maladie respiratoire chronique (mycoplasmose) des volailles. *Bul. Acad. Vét.*, 1960, *33*, 205-211.

[12] Brion (A.), Fontaine (M.), Fontaine (M.P.) et Pilet (Ch.). — Sur l'existence en France de la maladie respiratoire chronique des volailles. *Bul. Acad. Vét.*, 1958, *31*, 105-110.

[13] Calnek (B.W.) and Levine (P.P.). — Studies on experimental egg transmission of Pleuro-Pneumonia-like Organisms in chickens. *Avian Dis.*, 1957, *1*, 2, 207-222.

[14] Chalquest (R.R.) and Fabricant (J.). — Survival of P.P.L.O. injected into eggs previously dipped in antibiotic solutions. *Avian Dis.*, 1959, *3*, 257-271.

[15] Charbonnier (J.L.). — Contrôle de la Mycoplasmose des Gallinés. *Thèse Doct. Vét.*, Alfort, 1961, n° 12.

[16] Chu (H.P.), Wise (D.R.), Fuller (J.R.) and Muriel K. Boldero. — Mycoplasma in poultry : strains WS 7 and WR 1. *The Vet. Rec.*, may 1970.

[17] Corstvet (R.E.) and Mc Gill (L.D.). — Pathogenesis of Haemophilus gallinarum in the avian respiratory tract. *Poult. Sci.*, 1967, *46*, 1247-1248.

[18] Corstvet (R.E.) and Sadler (W.W.). — Une étude comparée des infections respiratoires simples ou mixtes chez le poulet: infections mixtes (avec *Mycoplasma gallisepticum*, le virus de la maladie de Newcastle et le virus de la bronchite infectieuse). *Am. J. Vet. Res.*, 1966, *27*, 1703.

[19] Cottereau (Ph.). — Mycoplasmose respiratoire des volailles : épizootiologie, diagnostic, prophylaxie. *Bull. Soc. Sci. Vét. et Méd. comparée*, Lyon, 1970, *72*, 653-676.

[20] Crawley (J.F.) and Fahey (J.E.). — The use of hemagglutination inhibition test for the control of pleuro-pneumonia-like organism infection in poultry. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1957, *130*, 4, 187.

[21] Dierks (R.E.), Newman (J.A.) and Pomeroy (B.S.). — Characterization of avian Mycoplasma. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1967, *143*, 1, 170-190.

[22] Fabricant (J.) and Levine (P.P.). — Experimental production of complicated respiratory disease infection (« Air-sac » disease). *Av. Dis.*, 1962, *6*, 1, 13-23.

[23] Fahey (J.E.) and Crawley (J.F.). — Studies on chronic respiratory disease of chickens : II. Isolation of a virus. *Can. J. Comp. Med.*, 1954, *18*, 13-21.

[24] Griess (F.). — Des maladies respiratoires chroniques des Gallinés : Etiologie et Prophylaxie. *Thèse Doct. Vét.*, Toulouse, 1969, n° 76.

[25] Gross (W.B.). — The development of « Air-Sac disease ». *Av. Dis.*, 1961, *5*, 431-439.

[26] Halen (P.). — Les mycoplasmes et leur rôle en pathologie. *Ann. Méd. Vét.*, 1967, *111*, 23-41.

[27] Hall (C.F.), Flowers (A.I.) and Grumbles (L.C.). — Dipping of hatching eggs for control of Mycoplasma gallisepticum. *Av. Dis.*, 1963, *7*, 2, 178-183.

[28] Hammerle (J.R.). — An engineering appraisal of egg shell strength evaluation techniques. *Poult. Sci.*, 1969, *48*, 5, 1708-1717.

[29] Harry (E.G.) and Hemsley (L.A.). — The association between the presence of septicaemia

strains of Escherichia coli in the respiratory and intestinal tracts of chickens and the occurrence of Coli septicaemia. *Vet. Rec.*, 1965, *77*, 35-40.

[30] Harry (E.G.) and Hemsley (L.A.). — The relationship between environmental contamination with septicaemia strains of Escherichia coli and their incidence in chickens. *Vet. Rec.*, 1965, *77*, 241-245.

[31] Hayflick (L.) and Chanock (R.). — Mycoplasma species of Man. *Bacteriological Reviews*, 1965, *29*, 2, 185.

[32] Inglis (J.M.) and Jones (R.C.). — Effect of dipping eggs in Spiramycin to inactivate Mycoplasma gallisepticum. *J. Comp. Path.*, 1966, *76*, 225-229.

[33] Kato (K.). — Infectious Coryza of chickens. V. Influence of Mycoplasma gallisepticum infection on chicken infected with Haemophilus gallinarum. *Natn. Inst. Anim. H. 1 th Q.*, 1965, *5*, 183-189; in *Vet. Bull.*, 1966, *36*, Abstr. n° 2488.

[34] Kottaridis (S.D.), Dunlop (W.R.) and Smith (S.C.). — Tissue culture propagated Mycoplasma for the control of the chronic respiratory disease. *Avian Dis.*, 1967, *11*, 528-531.

[35] Langmuir (A.D.). — Epidemiology of airborne infection. *Bac. Rev.*, 1961, *25*, 174-181.

[36] Le Bars (J.). — Flore atmosphérique des locaux d'élevage en aviculture : Propriétés physiques et biologiques. Pénétration dans l'appareil respiratoire. Conséquences pour l'assainissement de l'air. *Rec. Méd. Vét.*, 1968, *144*, 1163-1189.

[37] Levine (P.P.) and Fabricant (J.). — Effect of dipping eggs in antibiotic solutions on P.P.L.O. transmission in chickens. *Avian Dis.*, 1962, *6*, 72-86.

[38] Mc Martin (D.A.) and Adler (H.E.). — An immunological phenomenon in chickens following infection with Mycoplasma gallisepticum. *J. Comp. Path. Ther.*, 1961, *7*, 311.

[39] Madden (D.L.), Horton (R.E.) and Mc Cullough (N.B.). — Mycoplasma gallisepticum infection in germ-free and conventional chickens. Experimental studies with a culture of low virulence. *Am. J. Vet. Res.*, 1967, *28*, 517-526.

[40] Meurier (C.), Bennejean (G.) et Le Turdu (Y.). — Pertes économiques dues aux maladies en aviculture. Production de l'œuf de consommation. *Bul. information*, Station Expérimentale de Ploufragan, 1966, *6*, 32, 8.

[41] Minck (R.) et Fleck (J.). — Les formes L des bactéries. *Bull. Inst. Pasteur*, 1970, *2*, 259.

[42] Mongin et Lacassagne. — Etat actuel de nos connaissances sur la formation de la coquille. Journées scientifiques de l'Aviculture, Paris, 1961, 117-130.

[43] Olesiuk (O.M.), Van Roekel (H.) and Chandiramani (N.K.). — Control of experimental mycoplasma infection in young chickens with tylosin and others antibiotics. *Avian Dis.*, 1965, *9*, 1, 67-77.

[44] Olson (N.O.), Hash (T.R.), Heishmann (J.O.) and Campbell (A.). — Dipping of hatching eggs in erythromycin for the control of Mycoplasma. *Avian Dis.*, 1962, *6*, 2, 191-194.

[45] Olson (N.O.), Heishmann (J.O.) and Shelton (D.C.). — Control of chronic respiratory disease. V. Artificial exposure of young chickens to Mycoplasma gallisepticum. *Avian Dis.*, 1962, *6*, 171-177.

[46] Papageorgiou (C.). — Milieu pour l'isolement et

la culture des mycoplasmes à partir de produits pathologiques, de cultures cellulaires et de produits biologiques contaminés. *Bull. Acad. Vét.*, 1970, *43*, 357-361.

[47] Papageorgiou (C.). — Atténuation d'une souche de *Mycoplasma gallisepticum* pour la vaccination contre la mycoplasmose aviaire. *Bull. Acad. Vét.*, 1970, *43*, 363-370.

[48] Papageorgiou (C.). — Vaccination contre la mycoplasmose aviaire par mycoplasmes vivants atténués (souche C.P.). *Bull. Acad. Vét.*, 1970, *43*, 371-375.

[49] Papageorgiou (C.). — Méthode de titrage des anticorps inhibant la croissance des mycoplasmes (anticorps protecteurs). (Communication personnelle).

[50] Papageorgiou (C.), Valette (L.), Cherby (J.) et de Saint-Aubert (G.). — Les mycoplasmoses aviaires. *Rev. Méd. Vét.*, 1967, *118*, 4, 291-305.

[51] Perreau (P.). — Mycoplasma et formes L des bactéries. Cours de Microbiologie Systématique, Institut Pasteur, 1971.

[52] Price (K.E.), Zolli (Z.), Hardie (W.B.) and Galijan (M.J.). — Respiratory Tract Flora in C.R.D. and Effect of Antibiotics in the Feed. *Poult. Sci.*, 1957, *36*, 2, 219-225.

[53] Renault (L.), Guillon (J.C.) et Palisse (M.). — Contribution à l'étude de l'étiologie des affections respiratoires des volailles. *Bull. Acad. Vét.*, 1962, *35*, 283.

[54] Renault (L.) et Maire (C.). — Etat actuel des affections respiratoires du poulet de chair et de la poule pondeuse. *Cah. Méd. Vét.*, 1967, *36*, 1-13.

[55] Roberts (D.H.) and Mc Daniel (J.W.). —

Mechanism of egg transmission of Mycoplasma gallisepticum. *J. Comp. Path.*, 1967, *77*, 439-442.

[56] Sauter (E.A.) and Petersen (C.F.). — The effect of egg shell quality on penetration by Pseudomonas fluorescens. *Poult. Sci.*, 1969, *48*, 5, 1525-1528.

[57] Schellenberg (P.). — L'élevage orthoxénique : Pourquoi ? Conférence I.T.A.V.I., 1970.

[58] Smibert (R.M.), De Volt (H.M.) et Faber (J.E.). — Etude de la flore bactérienne du système respiratoire de poulets sains. *Poult. Sci.*, 1958, *37*, 159.

[59] Smibert (R.M.), Forbes (M.), Faber (J.E.), Gabuten (A.R.) and De Volt (H.M.). — Studies on « Air sac infection » in poultry : I. Infection of germ-free turkeys with Mycoplasma gallisepticum (avian P.P.L.O.) from sinus exudate and broth culture. *Poult. Sci.*, 1959, *38*, 676-684.

[60] Stephens (J.F.), Taylor (R.O.) and Barnett (B.D.). — Coccidiosis as a stress factor in the development of « Air sac disease ». *Poult. Sci.*, 1965, *44*, 1, 65.

[61] Stuart (E.E.) and Bruins (H.W.). — Preincubation immersion of eggs in erythromycin to control chronic respiratory disease. *Avian Dis.*, 1963, *7*, 3, 287-293.

[62] Subramanyam (P.) and Pomeroy (B.S.). — Studies on the Fahey-Crawley Virus. *Avian Dis.*, 1960, *4*, 165.

[63] Taillandier (J.J.). — Quelques précisions cliniques et pratiques concernant les mycoplasmoses aviaires. *Bul. S. Nat. Vét.*, 1968, *4*, 443-450.

[64] Tournut (J.) et Espinasse (J.). — Mycoplasmose respiratoire des Gallinés. Bases d'une prophylaxie; premiers résultats. XXXVII[e] session de l'O.I.E., 1969.

[65] Tournut (J.), Redon (P.) et Lacaze (B.). — Observations sur la mycoplasmose des Gallinés. *Rev. Méd. Vét.*, 1963, *114*, 22-32.

[66] Voeten (A.C.). — Holland's approach to the eradication of Mycoplasma spp. by egg dipping. International Poultry Ind. Exposition, Chicago, 1968.

[67] Warren (J.), Senterfit (L.B.) and Sieiro (F.). — Inactived culture vaccine against Mycoplasma gallisepticum infection of chickens. *Am. J. Vet. Res.*, 1968, *29*, 8, 1659-1664.

[68] Yoder (H.W.). — Mycoplasmose. Traitement des œufs par la chaleur. *Poultry Digest*, may 1969.

[69] Yoder (H.W.), Hofstadt (J.R.) and (M.S.). — Evaluation of tylosin in preventing egg transmission of Mycoplasma gallisepticum in chickens. *Avian Dis.*, 1965, *9*, 2, 291-301.